

MR-spektroskopische Metabolitenanalyse von Biopsatproben für die Tumordiagnose

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich 02 Biologie/Chemie
der Universität Bremen vorgelegt

von
Frauke Nehen

Bremen 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2007 bis September 2011 im Fachbereich Chemie der Universität Bremen am Lehrstuhl für instrumentelle Analytik unter Leitung von Prof. Dr. Dieter Leibfritz angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Leibfritz

2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Thiele

Tag des Promotionskolloquiums: 21.09.2011

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dieter Leibfritz für die guten Arbeitsbedingungen, die gewährten Freiheiten sowie seine stete Unterstützung und Förderung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Herbert Thiele möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Essentiell für diese Arbeit waren die Sammlung und Bereitstellung der Hirntumorbiopsate. Daher möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Rudolf Fahlbusch und Dr. Laura Columbano vom International Neuroscience Institute Hannover für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Herrn Johannes Stelten und Dr. Wieland Willker gilt mein Dank für die Einführung in die NMR-Spektroskopie und ihre Unterstützung bei schwierigen NMR-spektroskopischen Fragestellungen.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dorit Kemken und Dr. Thomas Dülcks für ihre Hilfestellung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen und ihre Ratschläge bei chromatographischen Aspekten.

Bei Herrn Bernd Merkel und Herrn Markus Harz vom Fraunhofer MEVIS Institut bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Anregungen bezüglich der statistischen Auswertung.

Für die Einarbeitung und die Unterstützung gerade zu Beginn dieser Arbeit danke ich zudem Dr. Jan Willmann.

Auch bei Jessica Thomssen und Serap Açikgöz möchte ich mich herzlich bedanken, die mit ihren Forschungs- und Diplomarbeiten mich unterstützt und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insgesamt gilt großer Dank der Arbeitsgruppe Leibfritz und den Mitarbeitern der in vivo-MR-Gruppe, die mit ihrer steten Hilfsbereitschaft, Unterstützung und dem damit verbundenem guten Arbeitsklima und der schönen Zeit maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Martin Ahrens, Serap Açikgöz, Linda Becker, Jessica Heins, Jane Mißler, Miriam Schwalbe-Herrmann, Dr. Markus Plaumann und Jonas Warneke für ihre Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik, ihre Motivation, die schöne Zeit und besonders für ihre Freundschaft.

Nicht zuletzt gilt ganz besonderer Dank meiner Familie sowie meinem Lebenspartner Ole Macke, die mich mit ihrem Verständnis, ihrer liebevollen Unterstützung und ihrer Motivation stets begleitet und mir Rückhalt gegeben haben.

Summary

Tumours are associated with a pathologically altered metabolism and reveal a characteristic metabolic profile which can be analyzed by NMR spectroscopy. Subjects of this study are malignant gliomas – the most common primary brain tumours among adults. Glioma tissues typically are heterogeneous with no distinct boundary to surrounding healthy tissue due to cell cluster migration. Consequently, gliomas tend to relapse after neurosurgical resection and have a poor prognosis. Thus, the investigation of the tumour margin is an important issue.

The aim of this study was twofold: The first topic was to characterize the regional metabolic profiles of different tissue sections of malignant gliomas (WHO grade III and IV) with NMR spectroscopy of hydrophilic and lipophilic tissue extracts, i.e. active viable tumour core, tumour margin and more distant tumour margin (as a substitute for healthy control tissue). The second topic was to compare the metabolic profiles of the different glioma types such as grade III and grade IV tumours, but also other primary tumours of the brain.

At first an optimized dual phase extraction procedure for (neuronal) tissues was developed in this thesis which enables a quantitative isolation of analytes under mild conditions. With this procedure 52 specimens of high grade gliomas were extracted and recorded by NMR spectroscopy. The tumours revealed characteristic metabolic profiles which reflected typical neoplastic alterations: Reduced amounts of N-acetylaspartate were caused by a loss of neuronal structures. High levels of branched chain amino acids, alanine, glycine and decreased amounts of creatine, glutamine, glutamate and succinate reflected an altered energy metabolism in the tumours. Glycine, alanine and hypotaurine were markers of malignancy and elevated in grade IV glioblastomas. Similarly, the phosphocholine to glycerophosphocholine ratio represented a metabolic marker for grade IV glioblastomas as a shift toward phosphocholine was observed preferentially in the glioblastoma extracts. In contrast, grade III gliomas were distinguished from grade IV tumours by increased amounts of taurine and scyllo- as well as myo-inositol.

Within the lipid extracts reduced amounts of plasmalogens, galactosyl cerebroside and cholesterol as well as increased levels of phosphatidylcholines and polyunsaturated fatty acids – in particular arachidonic and linoleic acid - were observed in neoplastic extracts reflecting disordered signaling pathways as well as a higher membrane turnover and an increased amount of membrane fluidity respectively. In particular, cholesteryl esters, triacylglycerides and dolichol(phosphate) were characteristics of tumour cells and thus indicators of malignancy. Within lipids differences between grade III and grade IV tumours were less distinctive compared to hydrophilic metabolites. Merely triacylglycerides seemed to be specific for grade IV glioblastomas, while dolichol(phosphate) was more abundant in grade III gliomas.

Pattern recognition methods were used in order to recognize relevant metabolites for an intratumoral discrimination of the three different tissue sections: a) Relevant metabolites were identified by means of partial least square regression. b) All components were evaluated based on their classification results with a linear discriminant analysis. c) Metabolite concentration profiles were visualized with self organizing maps.

Within hydrophilic metabolites N-Acetylaspartate and N-Acetylgalactosamine gave best classification results with a correct classification rate (accuracy) of 76% and 64%, respectively. Aspartate, creatine and glutamate were also important for the tumour delineation. These metabolites as well as N-acetylaspartate and N-acetylgalactosamine decreased from more distant tumour margin towards the tumour core. In addition, branched chain amino acids, alanine, asparagine and arginine showed characteristic concentration gradients in the self organizing maps with increasing amounts towards the tumour core.

Among lipids fatty acid residues (β -methylene protons), galactosyl cerebroside and dolichol(phosphate) exhibited highest correct classification rates (69%, 68%, and 66%, respectively). Triacylglycerides and cholesteryl esters were also important for an intratumoral delineation as both lipids were preferentially detected in tumour core and in some tumour margin extracts reflecting a higher amount of tumour cells in these biopsies. Similarly, cholesterol (decreasing towards tumour core), phosphatidylcholines (increasing towards tumour core) and several signals of fatty acid residues showed characteristic self organizing maps. In addition, the ratio of galactosyl cerebroside to sphingomyelins and the ratio of cholesterol to dolichol(-phosphate) represented better metabolic discriminators for the tumour delineation than the individual lipids.

Finally, an optimized solid phase extraction was developed to separate neural lipid extracts in different lipid classes (free fatty acids, neutral and acidic phospholipids, cholesteryl esters, triacylglycerides, cholesterol, di- and monoacylglycerides) and applied to a total of 14 lipophilic brain tumour extracts from the three different tumour regions. It was shown, that the higher content of polyunsaturated fatty acids in the extracts of the tumour core was associated with polar lipids confirming a higher demand of membrane fluidity and disordered signaling pathways (i.e. increased formation of eicosanoids from arachidonic acid). In contrast, polar lipids of the more distant tumour margin contained higher amounts of monounsaturated fatty acids compared to tumour core and tumour margin. In addition, linoleic acid correlated with cholesteryl esters and triacylglycerides.

In conclusion, distinct alterations in the metabolic profiles of hydrophilic as well as lipophilic extracts of the different tumour areas enable a distinction of active tumour core, tumour margin and more distant tumour margin. These differences are caused by a variable fraction of neoplastic cells in the biopsies, which decreases from tumour core over tumour margin to the more distant tumour margin, and further towards healthy cells with a tumour affected metabolism.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Zentrale Nervensystem.....	3
1.1.1	Aufbau und Funktion.....	3
1.1.2	Zelltypen und Stoffwechselprozesse	5
1.2	Hirntumoren	8
1.2.1	Definition und Inzidenz.....	8
1.2.2	Klassifikation und Graduierung.....	8
1.2.3	Ursachen und Entstehung.....	11
1.2.4	Charakteristika	14
1.3	Problemstellung der Arbeit.....	17
1.4	Die Probenaufbereitung	21
1.5	Mustererkennung	25
1.5.1	Datenvorverarbeitung.....	26
1.5.2	Klassifikation und Darstellung	28
1.6	NMR-Spektroskopie und Mustererkennung in der Analyse von Hirntumoren	35
2	Ergebnisse und Diskussion.....	42
2.1	Wahl eines geeigneten Extraktionsverfahrens.....	42
2.2	Manuelle Auswertung.....	46
2.2.1	Signalzuordnungen und Besonderheiten in den ¹ H-NMR-Spektren.....	46
2.2.2	Strukturaufklärung des unbekannten Lipids.....	51
2.2.3	Charakteristika der verschiedenen Tumorentitäten	58
2.2.4	Fazit.....	72
2.3	Mustererkennung	73
2.3.1	Vorgehensweise	73
2.3.2	Intratumorale Veränderungen der hydrophilen Komponenten	74
2.3.3	Intratumorale Veränderungen der Lipide	91
2.3.4	Diskussion	100
2.3.5	Zusammenfassung.....	101
2.4	Lipidauftrennung	103
2.4.1	Optimierung und Überprüfung der Festphasenextraktion	103
2.4.2	Ergebnisse	108
2.4.3	Diskussion	111
3	Zusammenfassung	112
4	Ausblick.....	114

5	Material und Methoden	115
5.1	Auswahl einer geeigneten Extraktionstechnik	115
5.1.1	Geräte	115
5.1.2	Chemikalien	115
5.1.3	Durchführung	115
5.2	Gewebeextraktion	118
5.2.1	Geräte und Chemikalien.....	118
5.2.2	Durchführung	118
5.3	Festphasenextraktion.....	120
5.3.1	Materialien	120
5.3.2	Chemikalien	120
5.3.3	Durchführung	120
5.4	Massenspektrometrie	121
5.5	NMR-Spektroskopie	122
5.5.1	Geräte	122
5.5.2	Deuterierte Lösungsmittel.....	122
5.5.3	¹ H-NMR-Spektren für die Mustererkennung	122
5.5.4	¹ H-NMR-Spektren zur Quantifizierung.....	123
5.5.5	2D NMR-Spektren	124
5.5.6	Spektrenprozessierung	125
5.5.7	Signalzuordnungen	125
5.6	Biopsate.....	125
5.7	Mustererkennung	127
5.7.1	Vorverarbeitung der Spektren für die Klassifikation:	127
5.7.2	Klassifikation	127
	Literaturverzeichnis	129
	Abkürzungsverzeichnis.....	147
	Abbildungsverzeichnis.....	149
	Tabellenverzeichnis.....	152
	Publikationsliste.....	153
	Anhang.....	154
1.	Beschriftung der funktionellen Gruppen der Lipidklassen	154
2.	Integrationsbereiche für den Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden.....	155

1 Einleitung

Der Zellstoffwechsel ist ein hochempfindliches und stark reguliertes System, welches direkt auf innere oder äußere Reize reagiert. Im pathophysiologischen Fall sind diese Mechanismen häufig gestört, so dass veränderte Verhältnisse der Stoffwechselkomponenten zu beobachten sind. Dies betrifft sowohl die wasserlöslichen Metabolite als auch die Lipide. Somit reflektiert der Stoffwechsel den aktuellen Gesundheitsstatus, wobei sich ein abnormer Metabolismus in der Regel noch vor einer morphologischen Änderung der Zellen zeigt^[1].

Die Veränderungen des Stoffwechsels lassen sich durch die Analyse von Gewebeextrakten nachvollziehen. Eine hervorragende Möglichkeit dafür ist die NMR-Spektroskopie, da im Prinzip mit einem einzigen Experiment die Gesamtheit der Komponenten erfasst und quantifiziert werden kann. Zudem beträgt die Messzeit nur wenige Minuten und die Proben können anschließend aufgrund des nicht-destruktiven Verfahrens mit weiteren Techniken untersucht werden. Deshalb wird die NMR-Spektroskopie in dieser Arbeit für die Analyse pathologischen Gewebes eingesetzt.

Gegenstand der Untersuchung sind maligne Gliome. Diese gehören zu den häufigsten Hirntumoren und sind durch ein destruktives und infiltratives Wachstum mit schlechter Prognose gekennzeichnet^[2]. Sie weisen eine diffuse Abgrenzung auf, d. h., es existiert keine eindeutige Trennung von Tumor und gesundem Gewebe. Die Tumorzellen migrieren in das umliegende Gewebe, so dass der aktive Tumorkern von einem Randgebiet umgeben ist, welches gesunde und entartete Zellen enthält. Zudem beginnt sich der Stoffwechsel der gesunden Zellen unter Tumoreinfluss zu verändern. Die Tumorabgrenzung gestaltet sich trotz des immensen Fortschritts der bildgebenden Verfahren (Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT)) in den letzten Jahrzehnten als problematisch. Erschwerend hinzu kommen Veränderungen in Lage und Form des Gehirns während des neurochirurgischen Eingriffs (*brain shift*). Eine vollständige Resektion eines Hirntumors ist schwierig, d. h. es bleiben häufig (unerkannte) Tumorzellen zurück, so dass es zu der Bildung von Rezidiven kommt. Eine radikale Entfernung von mehr als 98% des Tumors erhöht die durchschnittliche Überlebenserwartung um ca. vier Monate^[3], so dass die Bestimmung der Tumorabgrenzung von großer Bedeutung ist. Die *in-vivo*-Magnetresonanzspektroskopie (MRS) stellt für diese Problematik einen Lösungsansatz dar, da mit der MRS nicht nur morphologische sondern auch metabolische Informationen gewonnen werden. Hierfür fehlt jedoch bisher eine grundlegende Studie, in der die intratumoralen Veränderungen zunächst *ex vivo* untersucht werden.

Somit liegt das Ziel dieser Arbeit darin, verschiedene Bereiche des Tumors - aktives Tumorzentrum, Tumorrandzone und entferntes Randgebiet (als Ersatz für gesundes Gewebe) - metabolisch anhand hydrophiler und lipophiler Gewebeextrakte zu charakterisieren und Unterschiede zu identifizieren. Zu diesem Zweck wird die NMR-Spektroskopie in Kombination mit Mustererkennungsverfahren eingesetzt, da relevante Änderungen aufgrund der Komplexität der Extraktspektren verborgen bleiben können.

Durch die multivariate Analyse werden „Muster“ in den ^1H -NMR-Spektren erfasst und charakteristische Metabolite oder Metabolitenkombinationen für die intratumorale Unterscheidung bestimmt.

Des Weiteren erfolgt eine NMR-spektroskopische Charakterisierung der untersuchten Tumorentitäten. Zu den Gliomen zählen verschiedene Tumorarten, die sich aus unterschiedlichen glialen Vorläuferzellen entwickeln. Die Bestimmung der Metabolitenprofile dient einer Abschätzung der Unterschiede innerhalb der Tumoren.

Zudem liegt ein weiterer Aspekt dieser Arbeit in der Auftrennung von Lipidextrakten. Diese beinhalten verschiedene Lipidklassen, denen wiederum eine Vielzahl an verschiedenen Einzelspezies angehören. Für eine detaillierte Untersuchung des Lipidstoffwechsels ist daher eine chromatographische Auftrennung notwendig. Ziel ist es, eine Festphasenextraktion zur Auftrennung der Lipidklassen an die neuronalen Lipidextrakte anzupassen und zu optimieren, so dass anschließend Lipidextrakte der Hirntumoren aufgetrennt und analysiert werden können.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst ein Überblick über das Zentralnervensystem und die Hirntumoren gegeben, bevor die Problemstellung der Arbeit dargelegt wird. Zudem werden die für diese Arbeit relevanten Themen Probenvorbereitung und Mustererkennung erarbeitet und anschließend erfolgt eine Zusammenfassung der Literatur über NMR-Spektroskopie und Mustererkennung in der Analyse von Hirntumoren.

1.1 Das Zentrale Nervensystem

1.1.1 Aufbau und Funktion

Das menschliche Nervensystem besteht aus über 100 Milliarden Nervenzellen^[4], die im Zusammenschluss ein komplexes Steuerzentrum und Kommunikationsorgan bilden. Dieses steuert sowohl unbewusste als auch bewusste Vorgänge. Es kontrolliert und regelt zusammen mit dem hormonalen System die Homöostase, dirigiert und koordiniert eingehende Reize und dient ebenso der Ausführung höherer Funktionen (u. a. Kognition, Interpretation)^{[5],[6]}.

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst Gehirn und Rückenmark. Alle neuronalen Gewebe außerhalb des ZNS (Nerven- wie Gliazellen) werden zum peripheren Nervensystem (PNS) gezählt. Dieses leitet Nervenimpulse von der Peripherie zum ZNS und umgekehrt weiter.

Nach anatomischen Aspekten wird das ZNS in verschiedene Bereiche unterteilt (siehe Abbildung 1). Das Rückenmark (Medulla spinalis) tritt über das Hinterhauptsloch (*Foramen magnum*) der Schädelbasis aus und reicht beim Erwachsenen bis zum 1. bis 2. Lendenwirbel. Es bezieht sensorische Signale aus der Peripherie und dirigiert deren Bewegungen. Das verlängerte Rückenmark (Nachhirn, *Medulla oblongata*) schließt sich im Schädelinneren an das Rückenmark an und verbindet Letzteres mit dem Gehirn (Encephalon). Zusammen mit der Brücke (*Pons*) und dem Mittelhirn (*Mesencephalon*) bildet es den Hirnstamm.

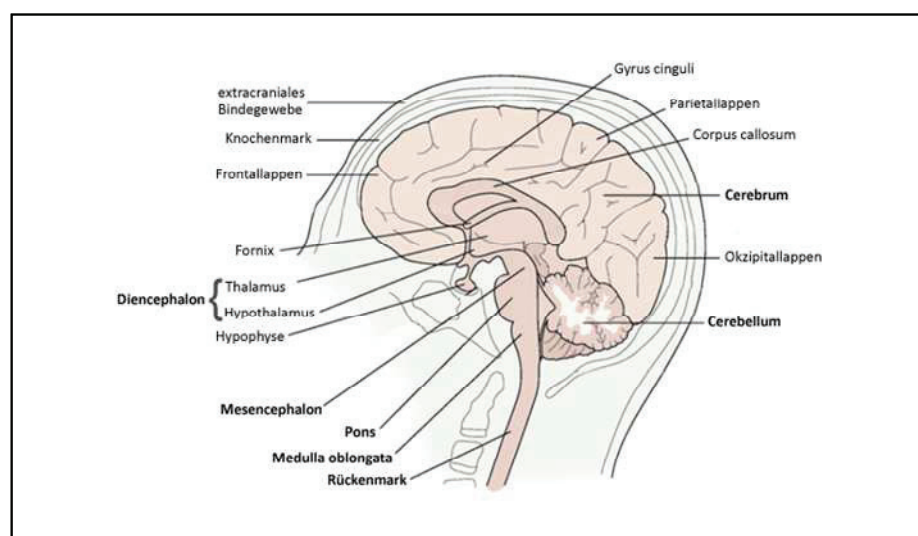


Abbildung 1: Medianschnitt durch das menschliche Gehirn (nach [6], S. 82).

Hier erfolgt neben der Informationsweiterleitung die Kontrolle von Reflexen und von sensorischen und motorischen Vorgängen. Ebenso liegen die Ursprungsorte der Hirnnerven sowie die Zentren zur Regulation lebenswichtiger Funktionen (u. a. Verdauung, Atmung, Herzschlag) im Hirnstamm.

Rückseitig zu diesem liegt das Kleinhirn (*Cerebellum*), welches u. a. die Feinabstimmung von Bewegungen sowie die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts steuert.

Das Zwischenhirn (*Diencephalon*) bildet die Fortsetzung des Hirnstamms und wird in Thalamus und Hypothalamus unterteilt. Während im Thalamus Informationen für das Großhirn verarbeitet werden, steuert der Hypothalamus die Funktionen des autonomen Nervensystems (u. a. Körpertemperatur, Nahrungsaufnahme, Hormonfreisetzung). Somit steht dieser in Wechselwirkung mit der Hypophyse (Hirnanhangdrüse), dem Schaltzentrum des hormonellen Systems.

Das Großhirn (Endhirn, *Cerebrum*) überdeckt das Zwischenhirn und setzt sich aus den beiden Großhirnhemisphären und den inneren Kernen (Basalganglien) zusammen. Die Oberfläche der Großhirnhemisphären ist durch zahlreiche Furchen und Windungen vergrößert. Hier befindet sich die Hirnrinde (*Cortex cerebri*), in der die Nervenzellkörper liegen (graue Substanz)¹. Die Nervenfasern (weiße Substanz) verlaufen dagegen im Inneren der Großhirnhemisphären (Marklager) und verbinden diese. Hier befinden sich zudem die inneren Kerne, die wiederum zu der grauen Substanz zählen. Im Großhirn werden die eingehenden Reize ausgewertet und Befehle ausgegeben. Dabei sind die verschiedenen Bereiche der Hirnhaut – Kortexareale - jeweils für bestimmte Funktionen zuständig. Im Hippocampus, ein weiterer Bereich des Endhirns, erfolgt dabei die Speicherung von Informationen (Gedächtnis) bzw. die Verarbeitung von Emotionen.

Gehirn und Rückenmark sind von drei Rückenmarks- bzw. Hirnhäuten (Meningen) umgeben: einer äußeren, harten Hirnhaut und zwei inneren, weichen Hirnhäuten. Zwischen Letzteren liegt ein mit Hirnflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) gefüllter Spalt, der Subarachnoidalraum (äußerer Liquorraum). Daneben befinden sich im Inneren des Schädels mit Liquor gefüllte Hohlräume (Hirnventrikel, innere Liquorräume), welche in Verbindung zum äußeren Liquorraum stehen. Zusammen mit den Hirnhäuten dient der Liquor dem Schutz und der Stabilisierung des Gehirns, aber auch dem Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten.

¹ Gewebe, die vor allem Nervenzellkörper mit Zellkernen beinhalten, werden als graue Substanz (*Substantia grisea*) bezeichnet. Strukturen, die überwiegend aus Nervenfasern bestehen, werden der weißen Substanz (*Substantia alba*) zugeordnet.

1.1.2 Zelltypen und Stoffwechselprozesse

Das Nervensystem besteht vorwiegend aus zwei Zelltypen, die sich morphologisch und funktionell unterscheiden. Neben den Neuronen (Nervenzellen), die für die Erregungsleitung zuständig sind, gibt es ektodermale Zellen, die Gliazellen. Zu diesen zählen die Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Mikroglia (ZNS) sowie Schwann- und Mantelzellen (PNS). Es kommen mindestens zehnmal mehr Gliazellen als Neuronen im ZNS vor. Zudem können sie im Gegensatz zu den Nervenzellen² proliferieren. Sie erfüllen neben ihrer Stütz- und Schutzfunktion vielfältige Aufgaben. Oligodendrozyten (ZNS) und Schwann-Zellen (PNS) bilden die so genannte Myelinschicht (Markscheide), die die Axone der Neuronen umgibt und elektrisch isoliert (siehe Abbildung 2a). Erstere sind ebenfalls in der grauen Substanz anzutreffen. Hier ist ihre Funktion jedoch noch ungeklärt^{[5],[6]}.

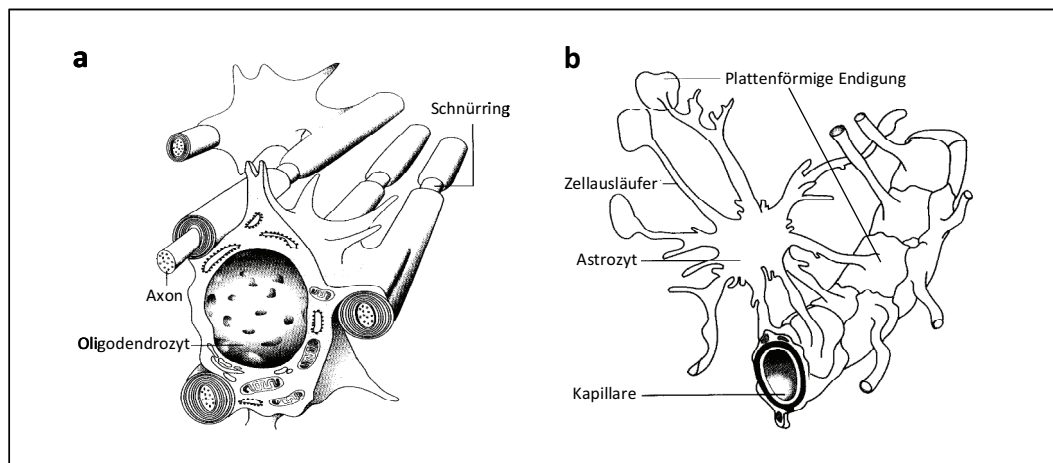


Abbildung 2: a) Oligodendrogliazelle, deren blattförmige Zellausläufer die Markscheiden bilden. b) Ausbildung einer Kapillargrenzschicht durch einen Astrozyten (nach [5], S. 50).

Die Mikrogliazellen zählen zu den Fresszellen (*Phagozyten*) und sind Teil des Abwehrsystems. Sie reagieren auf pathologische Ereignisse, beispielsweise sorgen sie für die Beseitigung nekrotischer Zellreste. Die Ependymzellen kleiden die Gehirnv ventrikel aus und grenzen das neurale Gewebe vom Liquor ab. Die Astrozyten, die größten und häufigsten Gliazellen, weisen eine sternförmige Morphologie mit vielen Zellfortsätzen auf. Neben ihrer Füllfunktion regulieren sie den Stoff- und Flüssigkeitstransport im Gehirn und kontrollieren die diversen Homöostasen (u. a. pH, Kalium etc.). Sie bilden über verbreiterte Füßchen ihrer Fortsätze Grenzschichten zu nicht neuronalen Geweben und Blutgefäßen (siehe Abbildung 2b) und können das

² Anmerkung: Inzwischen ist bekannt, dass adulte Stammzellen proliferieren und z. B. im Hippocampus neuronale Funktionen übernehmen^[7].

auskleidende Endothel der Kapillaren veranlassen *tight junctions*³ zu bilden (Blut-Hirn-Schranke).

Die glialen Endfüßchen stellen zudem die Hauptübergangsstellen zwischen Kapillaren (Blutsystem) und dem Gehirn (u. a. Glucosetransporter, Aquaporine etc.) dar. Des Weiteren können Astrozyten nach Verletzungen bzw. Nervenzelldefekten Narben bilden sowie Barrieren zwischen benachbarten Nervenzellen.

Neuronen werden in sensorische bzw. motorische sowie Interneuronen unterteilt. Sie alle bestehen aus einem Zellkörper (Soma/ Perikaryon), in dem die Zellorganellen lokalisiert sind, und mehreren Fortsätzen. Als Dendriten werden die Fortsätze bezeichnet, die Reize von anderen neuronalen Zellen empfangen und die Erregung zum Soma leiten. Fortsätze, die die Erregung elektrisch an andere Neuronen weiterleiten, werden dagegen als Axone bezeichnet. Diese weisen an ihren Enden Synapsen auf, die die Erregung chemisch auf benachbarte Zellen übertragen. Bei Eintreffen eines Signals schütten diese Neurotransmitter bzw. Neurohormone (neurosekretorische Neuronen) in den synaptischen Spalt bzw. in die Blutbahn aus. Nach ihrer Funktion werden exzitatorische und inhibitorische Synapsen unterschieden. Zudem werden die Nervenzelltypen nach morphologischen Kriterien differenziert. Diese sind beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt.

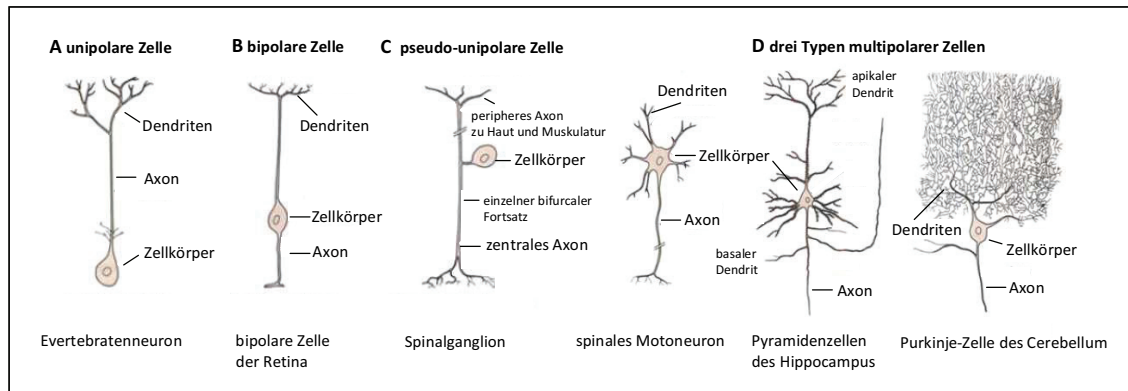


Abbildung 3: Morphologische Strukturen unterschiedlicher Nervenzelltypen (nach [6], S. 27).

Die Reizleitung erfordert eine spezielle Ionenkomposition, so dass Nervenzellen gegenüber Schwankungen wenig tolerant sind. Daher wird das Gehirn durch eine Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke geschützt. Im Blut transportierte Substanzen können damit in der Regel nicht in das Gehirn gelangen. Essenzielle Nährstoffe und Elektrolyte werden über selektive Ionenpumpen und Carrier dem Gehirn zugeführt^{[8],[9]}.

³ Die *tight junctions* sind über Membranproteine gebildete, bandenförmige Zusammenschlüsse der Zellmembranen, die einen Substanztransport durch die Interzellulaspalten behindern.

So bezieht es seinen Sauerstoff- und Glucosebedarf zur Energiegewinnung direkt aus dem Blut. Im Vergleich zur Leber werden nur geringe Mengen an Glucose in Form von Glykogen in den Astrozyten gespeichert. Das Gehirn ist jedoch in der Lage bei Glucosemangel durch längere Hungerperioden einen katabolen Stoffwechselweg zu nutzen und β -Hydroxybutyrat (Ketonkörper) umzusetzen. Dieses wird in den Hepatozyten (Leberzellen) aus freien Fettsäuren gebildet. Sind auch diese Speicher aufgebraucht, wird Glucose über die Gluconeogenese aus Muskelproteinen gewonnen. Unter normalen, aeroben Bedingungen wird Glucose durch die Glycolyse in zwei Moleküle Pyruvat transformiert, die nach der Oxidation zu Acetyl-CoA-Einheiten im Citratzyklus metabolisiert werden. Über diesen Weg wird fast das ganze vom Gehirn benötigte ATP (Adenosintriphosphat) gewonnen. Ein Großteil davon erfordert der aktive Transport von Kalium- und Natriumionen, um das Ruhepotential aufrechtzuerhalten. Diese werden durch die Natrium-Kalium-ATPase, einem Transmembranprotein, unter ATP-Verbrauch entgegen des Ladungs- und Konzentrationsgradienten in die bzw. aus der Nervenzelle hinaus transportiert.

1.2 Hirntumoren

1.2.1 Definition und Inzidenz

Unter dem Begriff Neoplasien werden raumfordernde Prozesse zusammengefasst, bei denen Mechanismen außer Kontrolle geraten sind, die Zellteilung, Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) steuern. Diese sind zugunsten der Proliferation (Zellvermehrung) verschoben. Dabei werden benigne und maligne Tumoren unterschieden. Als gutartig (benigne) werden Zellwucherungen bezeichnet, die zwar eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, aber das umliegende Gewebe nicht zerstören und nicht streuen. Bösartige (maligne) Tumoren zeigen dagegen ein infiltratives und destruktives Wachstum und metastasieren^[10].

Tumoren sind nach den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, wobei Lungenkarzinome bei Männern und Mammakarzinome bei Frauen die höchsten Mortalitätsraten aufweisen. Etwa 3,4% (Frauen) bzw. 3,1% (Männer) der Todesfälle durch Tumorerkrankungen gehen auf maligne Hirntumoren zurück^[11]. In Westeuropa, Nordamerika und Australien liegt die Inzidenzrate für primäre, intrakranielle Neubildungen (inklusive Meningeome) bei 6-11 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr^[2]. Tumorinzidenzen hängen dabei von Lebensalter und Geschlecht ab. Während bei Kindern Hirntumoren nach den Leukosen zu den häufigsten Neubildungen zählen, treten diese im jugendlichen Organismus seltener auf und häufen sich mit dem Alter wieder^[12]. Zudem sind bei einigen Tumoren Geschlechtsdispositionen bekannt. So treten Gliome häufiger bei Männern als bei Frauen auf, während es sich bei Meningeomen (Wucherungen der Hirnhäute) umgekehrt verhält^{[13],[14]}.

1.2.2 Klassifikation und Graduierung

Die Einteilung und Graduierung der Tumoren des ZNS erfolgt nach Ursprungsgewebe und histopathologischen Merkmalen, so dass eine Vielzahl verschiedener Hirntumorentitäten unterschieden wird. Dafür wurde 1979 von der WHO (*world health organisation*) ein Kategorisierungssystem für Tumoren des ZNS veröffentlicht, um eine global einheitliche und exakte Diagnose zu gewährleisten. Dieses wurde zuletzt im Jahr 2007 aktualisiert^[15].

Es umfasst diverse histologische bzw. morphologische Kriterien. Entscheidend für die Einschätzung der biologischen Wertigkeit sind beispielsweise das Ausmaß der Zelldifferenzierung, die zelluläre und nukleäre Polymorphie, die Tumorzelldichte, die mitotische Aktivität, die Endothelproliferate und Tumorgewebsnekrosen. Es erfolgt eine Einteilung in vier Stufen: Grad I, II, III und IV. Dabei entspricht Grad I einem gutartigen Tumor mit hoher Differenzierung der Zellen, langsamer Wachstumsrate und günstiger Prognose, während Grad IV einem bösartigen Tumor mit geringer Differenzierung,

hoher Proliferationsrate und ungünstiger Prognose zugeordnet wird (siehe Tabelle 1)^[16].

In der Regel reicht eine operative Entfernung von Gehirntumoren von Grad I und II aus, während sich bei den malignen Tumoren (Grad III und Grad IV) meist zusätzlich eine postoperative Therapie (Radio- und/oder Chemotherapie) anschließt^[16].

Tabelle 1: Charakteristika von Grad I bis IV Tumoren (nach [17], S.878).

Charakteristika	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
mitotische Aktivität	gering	gering	hoch	hoch
nukleäre Atypie	gering	vorhanden	vorhanden	vorhanden
zelluläre Atypie	-	-	vorhanden	vorhanden
infiltratives Wachstum	-	möglich	vorhanden	stark
Rezidivbildung	-	möglich	häufig	häufig
Nekrose	-	-	-	vorhanden
Neubildung von Gefäßen	-	-	-	vorhanden

Unterschieden werden primäre Hirntumoren von Meningeomen und Metastasen von Körpertumoren. Ein Großteil der primären Hirntumoren entsteht aus den Gliazellen (Gliome), da sich Neurone in der Regel im Erwachsenenalter nicht mehr teilen. So gehen etwa 30% der Neoplasien im ZNS auf Gliome zurück (siehe Abbildung 4). Unter den malignen Tumoren nehmen sie 79% ein^[13]. Die verschiedenen Tumorentitäten der Gliome und ihre Graduierung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

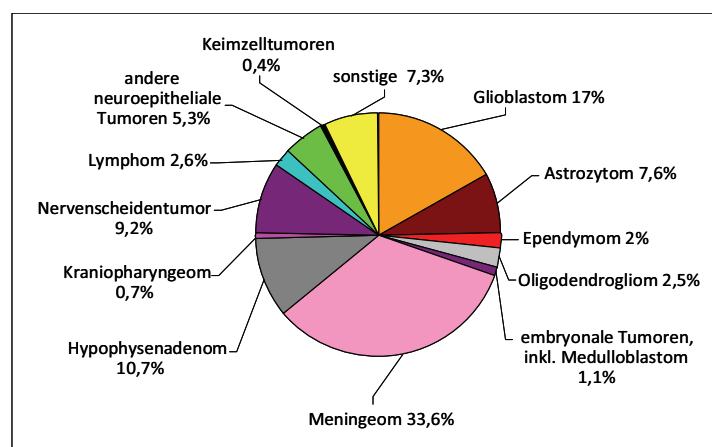


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Hirntumorentitäten nach [13].

Tabelle 2: Ausgewählte Tumorentitäten des ZNS und ihre Graduierung nach [19].

Tumorfamilie	Tumorentität	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Astrozytäre Tumoren	subependymales Riesenzell-astrozytom	X			
	pilozytisches Astrozytom	X			
	pilomyxoides Astrozytom		X		
	diffuses Astrozytom		X		
	pleomorphes Astrozytom		X		
	anaplastisches Astrozytom			X	
	Glioblastoma multiforme				X
	Riesenzellglioblastom				X
	Gliosarcom				X
Oligodendrogliale Tumoren	Oligodendrogliom		X		
	Anaplastisches Oligodendrogliom			X	
Oligoastrozytäre Tumoren (Mischgliome)	Oligoastrozytom		X		
	Anaplastisches Oligoastrozytom			X	

Astrozytome können in allen vier Malignitätsgraden auftreten. Während das gutartige pilozytische Astrozytom vorwiegend im Kindes- und Jugendalter diagnostiziert wird, manifestieren sich das diffuse und anaplastische Astrozytom im Erwachsenenalter. Letztere neigen zu einer malignen Progression bis hin zum Glioblastom (Glioblastoma multiforme, GBM)^[18]. Dieses tritt mit ca. 50% unter den Gliomen am häufigsten auf^[13] und ist der aggressivste Vertreter der Hirntumoren mit einer mittleren Überlebenszeit von 9 bis 12 Monaten^[17]. GBM sind heterogen und wachsen stark infiltrierend. Entscheidend für die Abgrenzung zu anderen malignen Entitäten sind vor allem die Gefäßproliferaten und die Anwesenheit von flächenförmigen Tumorgewebsnekrosen (vgl. Tabelle 1). GBM sind in den Großhirnhemisphären oder im Balken (Schmetterlingsgliom) lokalisiert, gelegentlich auch multifokal. Sie häufen sich im höheren Lebensalter. Zudem werden primäre, d. h. *de novo* gebildete Glioblastome von sekundären Glioblastomen (Rezidive von vordiagnostizierten, niedergradigen Astrozytomen) unterschieden^[18].

Oligodendrogliome treten seltener auf als Astrozytome und Glioblastome. Sie häufen sich im mittleren Lebensalter, kommen hauptsächlich in den Großhirnhemisphären vor und neigen dazu, den Subarachnoidalraum zu infiltrieren. Zudem sind Verkalkungen an der Infiltrationszone und Einblutungen für diesen Phänotyp charakteristisch.

Mischgliome – beispielsweise Oligoastrozytome – gestalten sich dagegen als diagnostisch schwierig, da ihre Abgrenzung nicht immer eindeutig ist. Es muss für beide Phänotypen mindestens eine charakteristische Komponente nachgewiesen werden.

Ferner sind viele weitere Entitäten bekannt, beispielsweise Medulloblastome, Neuroblastome und Plexuskarzinome, die aus anderen Ausgangszellen entstehen. Auch werden verschiedene Tumoren meningealen Ursprungs unterschieden. Zudem neigen einige nicht-hirneigene Tumorerkrankungen - wie Lungen- und Brusttumore sowie das maligne Melanom der Haut - dazu, in das Zentralnervensystem zu metastasieren.

1.2.3 Ursachen und Entstehung

Auslösende Faktoren/ Risikofaktoren sind bei den meisten Hirntumoren im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen (u. a. Haut- und Lungenkrebs) unbekannt. Lediglich eine erhöhte Exposition ionisierender Strahlung ist in Zusammenhang mit der Pathogenese von Hirntumoren zu bringen. Zudem kann eine genetische Prädisposition mit einigen erblichen Krankheiten einhergehen. Die Bildung von ZNS-Lymphomen wurde bei Immunsuppressionen (u. a. bei Organtransplantationen) beobachtet^[14].

Für die Entstehung von Tumoren sind die Abläufe des Zellzyklus entscheidend. Dieser besteht aus einer geordneten Reihenfolge von Prozessen, in deren Verlauf es zu einer Replikation der Zelle kommt (Abbildung 5). Es werden vier verschiedene Phasen unterschieden. An die Mitose und Cytokinese (Zellkern- bzw. Zellteilung, M-Phase) schließt sich die G_1 -Phase an (präsynthetische Wachstumsphase), in der die Zellmasse vergrößert und die für die folgende DNA-Synthese notwendigen RNAs und Proteine synthetisiert werden. In dieser Phase wird anhand von exogenen Faktoren (z. B. (Anti-) Wachstumssignale) und der Umgebung (Nährstoffgehalt, Zelldichte) entschieden, ob eine weitere Zellteilung stattfindet oder ob die Zelle in den Ruhezustand G_0 gelangt^[20].

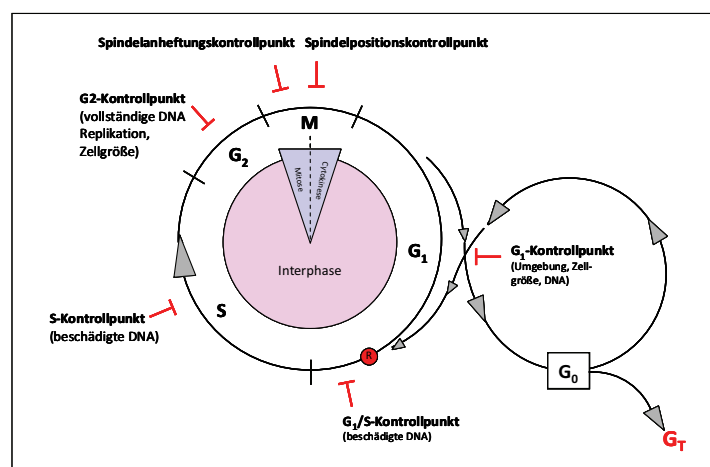


Abbildung 5: Zellzyklus eukaryontischer Zellen. Modifizierte Darstellung nach [20], S. 887 und [10], S.1).

In der G₀-Phase kann die Zelle verweilen, in den Zellzyklus zurückkehren oder differenzieren (Eintritt in die terminale Differenzierung G_T, postmitotischer Zustand). In G₁ liegt ebenfalls der Restriktionspunkt. Ist dieser überschritten, ist eine Rückkehr in den Ruhezustand nicht mehr möglich und die Zelle tritt anschließend in die S-Phase ein (Synthese-Phase). Hier wird der Chromosomensatz verdoppelt. Danach folgt die G₂-Phase (postsynthetische Wachstumsphase), in der sich die Zelle auf die bevorstehende Mitose vorbereitet. Der Abschnitt zwischen zwei Mitosen wird Interphase genannt.

Der Zellzyklus unterliegt einem unabhängigen Kontrollsystem, das durch innere und äußere Regulationsmechanismen gesteuert wird. An bestimmten Kontrollpunkten (⊥) kann der Zellzyklus angehalten werden, falls die Vorgänge nicht erfolgreich abgeschlossen wurden oder eine Schädigung der DNA vorliegt. Somit wird der Zelle Zeit gegeben, die Schäden zu beheben. Zentrale Bestandteile des Kontrollsystems bilden verschiedene cyclinabhängige Kinasen (Cdks, *cyclin dependent kinases*), die nach ihrer Aktivierung⁴ die unterschiedlichen Vorgänge des Zellzyklus einleiten.

Der intrazellulären Kontrolle unterliegen verschiedene Schritte: Es wird sichergestellt, dass nur eine DNA-Replikation pro Zellzyklus stattfindet, die Mitose nur nach einer vollständigen Verdoppelung der DNA abläuft (G₂-Kontrollpunkt) und die Zellteilung bei beschädigter DNA nicht stattfindet (G₁-, G₁/S-, S- und G₂-Kontrollpunkte). Ebenso wird in der Mitose-Phase überprüft, ob alle Chromosomen an die mitotische Spindel gebunden sind (Spindelanheftungskontrollpunkt) und ob nach der Anaphase alle Chromosomen ordnungsgemäß getrennt wurden (Spindelpositionskontrollpunkt). Zudem wird der Zellzyklus mit der Zellgröße koordiniert (G₁- und G₂-Kontrollpunkte), um diese konstant zu halten.

Extrazelluläre Kontrollmechanismen setzen vor allem in der G₁-Phase an. Diese steuern ebenfalls Zellgröße und -teilung. So erhalten Zellen durch Wachstumsfaktoren, die von anderen Zellen/Zelltypen sezerniert werden (*heterotypic signaling*), positive Signale für eine Zunahme der Zellmasse. Mitogene⁵ stimulieren vor allem die Aktivität von Cdks, die an der G₁-Phase und der Einleitung der S-Phase beteiligt sind. Ebenso können auch hemmende Signalproteine den Zellzyklus in G₁ verharren lassen oder die Apoptose einleiten. Letztere wird u. a. durch den Entzug von Überlebensfaktoren ausgelöst.

Die Zellumgebung ist zudem entscheidend für die Zellteilung. Bei zu großer Zelldichte wird die Zellteilung unterdrückt (dichteabhängige Hemmung) und auch, wenn die Zelle nicht mehr verankert ist (Verankerungsabhängigkeit). In gesunden Zellen verursachen anormale Proliferationssignale durch Rückkopplungsschleifen den Stillstand des

⁴ Die Aktivierung der Cdks wird über drei Mechanismen gesteuert: Cyclinkonzentration (reguliert durch Proteolyse und Transkription der entsprechenden Gene), Phosphorylierung/Dephosphorylierung und Cdk-Inhibitor-Proteine (CKIs).

⁵ Proteine, die die negative Kontrolle des Zellzyklus aufheben, bspw. PDGF (Blutplättchenwachstumsfaktor) oder EGF (epidermaler Wachstumsfaktor). Diese binden an Rezeptoren der Zelloberfläche und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, wodurch die Cdks aktiviert werden.

Zellzyklus oder die Apoptose. Diese homöostatische Zellregulierung ist in Tumoren außer Kraft gesetzt.

Die maligne Transformation umfasst sechs wesentliche Charakteristika^[21]. Tumorzellen sind nicht auf exogene Wachstumssignale angewiesen, da sie diese selbst bilden (autokrine Stimulation) bzw. ihre Nachbarzellen anregen diese freizusetzen. So synthetisieren GBMs die Wachstumsfaktoren PDGF (*platelet derived growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) selbst^[22]. Ebenso wird der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) in Hirntumoren überexprimiert, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber Wachstumssignalen gesteigert wird. Des Weiteren sind maligne Tumoren gegenüber Antiwachstumssignalen wie TGF β (transformierender Wachstumsfaktor) immun, die die Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) verhindern und somit die Proliferation blocken.⁶ Zudem sind Tumoren in der Lage Apoptose zu umgehen (u. a. Verlust des p53 Tumorsuppressor Gens) und sie weisen ein grenzenloses Replikationspotential auf, welches in gesunden Zellen begrenzt ist (*Senescence*, Zellalterung). Daneben sind sie in der Lage die Gefäßbildung zu beeinflussen (Angiogenese), um sich mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Ebenso infiltrieren sie das umliegende Gewebe (Verlust der Zell-Zell-Adhäsion) und metastasieren. Inzwischen werden zudem zwei weitere Eigenschaften als typische Charakteristika der malignen Transformation angesehen: der veränderte Energiestoffwechsel (vgl. Kapitel 1.2.4) und die Fähigkeit das Immunsystem zu umgehen^[23].

Diese neoplastische Entwicklung erfolgt durch einen von der Mikroumgebung geschaffenen Selektionsdruck, der zu einer somatischen Evolution führt. Mit der Annahme dieser acht Eigenschaften, welche als phänotypische Adaptionen angesehen werden, können Tumorzellen diese Proliferationsbarrieren überwinden. Dies können sie über verschiedene Strategien (z. B. unterschiedliche genetische Veränderungen) erreichen (Äquivalenzprinzip)^[24].

Nach dem Modell der klonalen Evolution vollzieht sich die Tumorgenese in mehreren Stufen durch natürliche Selektion ausgehend von einer einzigen Zelle, evtl. einer Stammzelle (siehe unten)^{[10],[21]}. Diese erfährt durch eine genetische Mutation einen Wachstumsvorteil, den sie an ihre Tochterzellen vererbt. Eine solche Tochterzelle unterliegt wiederum einer zweiten Mutation, die ihr einen weiteren Wachstumsvorteil verschafft usw. Dieser Ablauf gleicht einem darwinistischen Prozess, aus dem letztendlich ein Tumor hervorgeht^[21]. In gesunden Zellen ist die Wahrscheinlichkeit einer Mutation nur sehr gering. Somit wird angenommen, dass während der Tumorgenese auch Mechanismen außer Kraft gesetzt werden, welche die Konstanz der DNA garantieren^[10].

⁶ pRb kontrolliert das Genregulatorprotein E2F, welches die Transkription von S-Phase-Genen steuert, die wiederum die für den Eintritt in die S-Phase nötigen Proteine codieren. Durch die Phosphorylierung des pRb wird es inaktiviert und E2F aktiviert. TGF β verhindert diesen Schritt.

Mit dem Nachweis von neuronalen Stammzellen und glialen Vorläuferzellen im adulten Gehirn wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese einer malignen Transformation zu Tumorstammzellen unterliegen und den Ursprung für Hirntumoren bilden (Tumorstammzellen-Hypothese)^[17]. Dabei sind nur kleine Zellpopulationen – auch als *side populations* bezeichnet – im Tumor vorhanden. Diese weisen Stammzeleigenschaften auf, wie Selbsterneuerung, Proliferations- und Migrationsfähigkeit, Affinität zu Blutgefäßen und Therapieresistenz und werden für die Rezidivbildung verantwortlich gemacht. Der Großteil eines Tumors besteht dagegen aus spezifizierteren Zellen, deren Proliferationspotenzial geringer ist.

Die genauen Ursprungszellen für die verschiedenen Gliome sind jedoch noch unbekannt. Diese könnten aus verschiedenen Vorläuferzellen entstehen (siehe Abbildung 6)^[25].

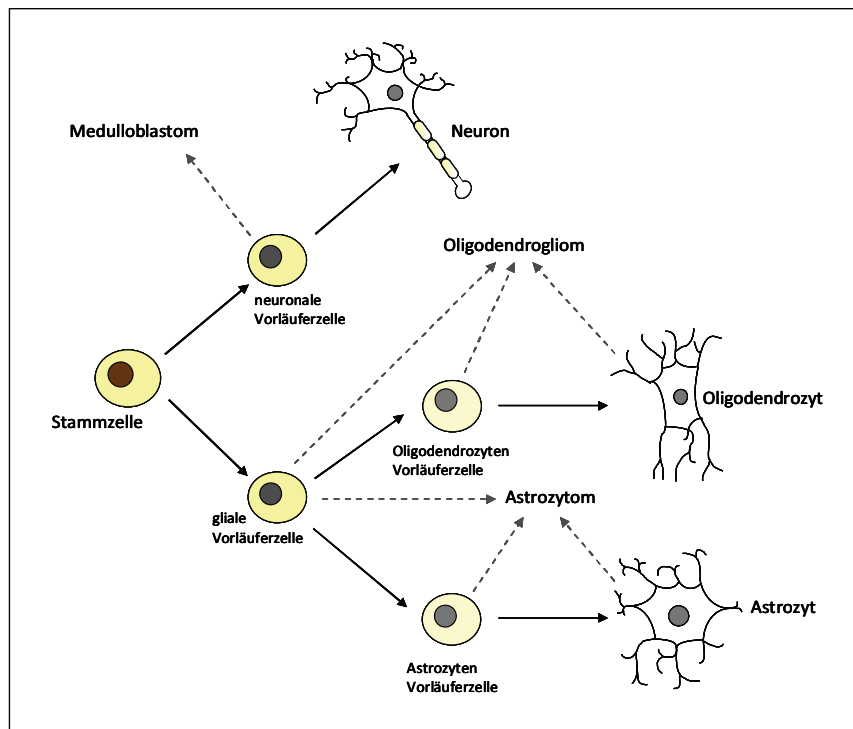


Abbildung 6: Mögliche Ursprungszellen für Hirntumoren (nach [25]).

1.2.4 Charakteristika

Hirntumoren weisen im Vergleich zu extracerebralen Raumforderungen Besonderheiten auf. Aufgrund der räumlichen Begrenzung durch den Schädel erweisen sich alle Neubildungen als kritisch, da sie zu einer Erhöhung des Hirndrucks führen. Auch ihre Lage ist entscheidend. Während es in stummen Arealen häufig erst spät zu Symptomen kommt, können in anderen Bereichen – z. B. am Hirnstamm – schon kleinste Raumforderungen große Auswirkungen nach sich ziehen.

Im Gegensatz zu Tumorerkrankungen anderer Organe zeigen niedrig maligne Hirntumoren keine Kapselbildung und können auch infiltrativ wachsen (bspw. diffuses Astrozytom Grad II^[19]). Eine weitere Besonderheit ist die Progression zu höher malignen Stufen, die speziell bei den astrozytären Tumoren entlang der Entdifferenzierungsreihe zu beobachten ist. Zudem metastasieren hirneigene, maligne Tumoren nur selten in die Peripherie^[16]. Indes wird häufig eine Migration von Zellverbänden entlang der myelinisierten Axone, der Basalmembran von Gefäßen oder entlang des Ventrikel auskleidenden Endothels beobachtet^[17].

Eine weitere Eigenschaft von Hirntumoren ist ihre Heterogenität, d. h., innerhalb eines Tumors können Zellen eine unterschiedliche Morphologie^[26] und Proliferationsaktivität^[27] aufweisen wie auch verschiedene genetische Veränderungen^[28]. Diese intratumorale Heterogenität kann entweder regional oder diffus auftreten^[29]. Bei einer regionalen Verteilung ähneln sich nur benachbarte Zellen. Weiter auseinanderliegende Zellen weisen Unterschiede auf. Bei einer diffusen Heterogenität sind die unterschiedlichen Zellen über den Tumor verstreut. Für die Diagnostik und die darauf basierende Therapie ist entscheidend, den bösartigsten Zelltyp zu identifizieren.

Daneben bestehen Hirntumoren meist aus einem nekrotischen und einem aktiven Tumorteil, welcher von einer Randzone umgeben ist. Dieses Randgewebe enthält gesunde und entartete Zellen, so dass die Grenzenfestlegung erschwert ist. Bei der Resektion muss somit ein Gleichgewicht zwischen der Erhaltung vitaler Strukturen und einer möglichst radikalen Entfernung gefunden werden. Darüber hinaus beginnt das histopathologisch gesunde, tumornahe Gewebe (*tissue at risk*) bereits seinen Stoffwechsel unter Tumoreinfluss zu ändern. Der nekrotische Bereich entsteht bei schnell wachsenden Tumoren, die der Nährstoffversorgung entwachsen. Dadurch kommt es zu einer Unterversorgung und folglich zu einem Absterben der Zellen. Aber Tumoren weisen auch hypoxische Bereiche auf, die existenzfähige, entartete Zellen enthalten. Mit der Sauerstoffunterversorgung geht eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Hypoxie induzierbarer Faktor) einher^[30]. HIFs regulieren Gene, die u. a. wichtige Proteine für die Proliferation, Angiogenese und die pH-Regulation codieren (siehe Abbildung 7).

Auch ein erhöhter Glucoseverbrauch - ein weiteres wichtiges Merkmal von Tumoren - wird mit HIFs in Zusammenhang gebracht. Viele Tumoren weisen (ebenso wie normale proliferierende Zellen) auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine erhöhte Glykolyserate auf (Warburg Effekt)^{[31]-[33]}. Häufig werden die an der Glykolyse beteiligten Enzyme überexprimiert^[34]. Zudem können in Tumoren mitochondriale Dysfunktionen auftreten, die zu der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen^[33]. Diese beeinträchtigen den Citratzyklus, indem sie unter anderem die Fe²⁺ abhängige Aconitase inaktivieren^[34]. Somit kann Citrat nicht zu Isocitrat isomerisiert werden. Überschüssiges Citrat wird durch ein Shuttlesystem aus der inneren Mitochondrienmatrix in das Cytosol transportiert. Dort wird es über die Citratlyase unter ATP-Verbrauch zu Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A umgewandelt. Letzteres ist Ausgangsstoff für die Fettsäure- und Steroidbiosynthese, so dass es in Tumoren zu einer erhöhten Synthese von Cholesterol und Fettsäuren kommt^[35].

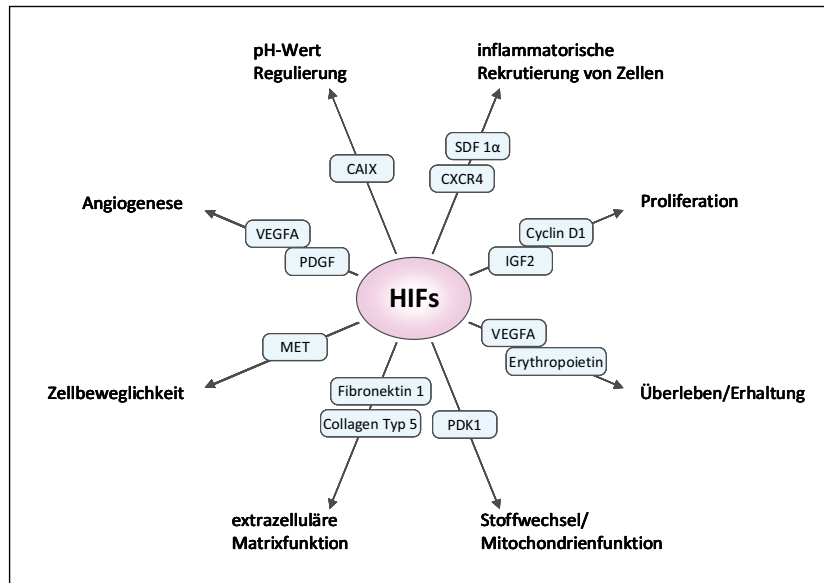


Abbildung 7: Gene, die durch HIFs aktiviert werden (nach [30]).

Der Energiestoffwechsel verläuft jedoch nicht nur über die aerobe Glykolyse, ebenso wird Energie durch die anaerobe Glykolyse und den oxidativen Stoffwechsel von Glutamin (Glutaminolyse) gewonnen^[31]. Dabei wird Glutamin in den Mitochondrien über die Glutaminase, die in Tumoren häufig überexprimiert wird, zu Glutamat umgewandelt. Dieses wird zu α -Ketoglutarat transaminiert und tritt so in den Citratzyklus ein. Hier wird es u. a. weiter zu Oxalacetat verstoffwechselt, welches über das Aspartat-Malat-Shuttle ins Cytosol transportiert werden kann. Dort wird es wieder zu Malat reduziert und es erfolgt die Bildung von Pyruvat und Lactat^[34].

Da durch die Glykolyse deutlich weniger ATP produziert wird als über den Citratzyklus (2 Moleküle ATP pro Molekül Glucose gegenüber 36 ATP pro Molekül Glucose), ist die Energiegewinnung nach Gillies et al. über diesen Pfad nebensächlich^[31]. Entscheidender ist die Entstehung einer aciden, toxischen Umgebung durch die Bildung von Lactat und der Freisetzung von Protonen. Diese beeinträchtigt die angrenzenden gesunden Zellen stärker als die Tumorzellen. Zudem kann eine erniedrigte Perfusion diesen Effekt verstärken.

Somit erzeugen Tumore einen niedrigeren extrazellulären pH-Wert (Acidose) im Vergleich zu gesunden Zellen ($\sim \text{pH}_e$ 6.8 bzw. $\sim \text{pH}_e$ 7.3). Der intrazelluläre pH-Wert von Tumorzellen ist dagegen neutral bis leicht alkalisch^[32]. Hypoxie und Acidose sind zwei wichtige Merkmale von Tumoren. Durch sie werden Zellen selektiert, die in der Lage sind die Apoptose zu umgehen^[31].

1.3 Problemstellung der Arbeit

Pathologische Zellveränderungen manifestieren sich zunächst im Stoffwechsel, bevor es zu morphologischen Veränderungen kommt^[1]. Erstere können von der genetischen Ebene über die Stufe der Proteine bis hin zu den Metaboliten reichen. Somit spiegelt die molekulare Zusammensetzung den aktuellen Stoffwechselstatus wider, wobei im pathophysiologischen Fall in der Regel die Verhältnisse der Metabolite untereinander verändert sind^[36]. Die Untersuchung von Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Liquor Cerebrospinalis etc.) oder Gewebebiopsaten liefert daher Informationen über (anomale) metabolische Veränderungen. Diese sind für das Verständnis der zugrunde liegenden biochemischen Abläufe wichtig. Zudem ist die Kenntnis der relevanten Stoffwechselprodukte für die Diagnostik und die Entwicklung von Therapieansätzen hilfreich.

Für die Untersuchung des Metabolitenprofils bietet sich als analytische Methode die NMR-Spektroskopie an. Gewebeextrakte, Körperflüssigkeiten sowie intakte (perfundierte) Zellen, Organe oder Biopsate können direkt oder nach einfacher Probenaufbereitung analysiert werden. Die Stoffwechselprodukte werden in einem einzigen Experiment gleichzeitig detektiert und quantifiziert (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Dies ermöglicht sowohl einen großen Probendurchsatz als auch anschließende Analysen, da die Proben nicht zersetzt werden.

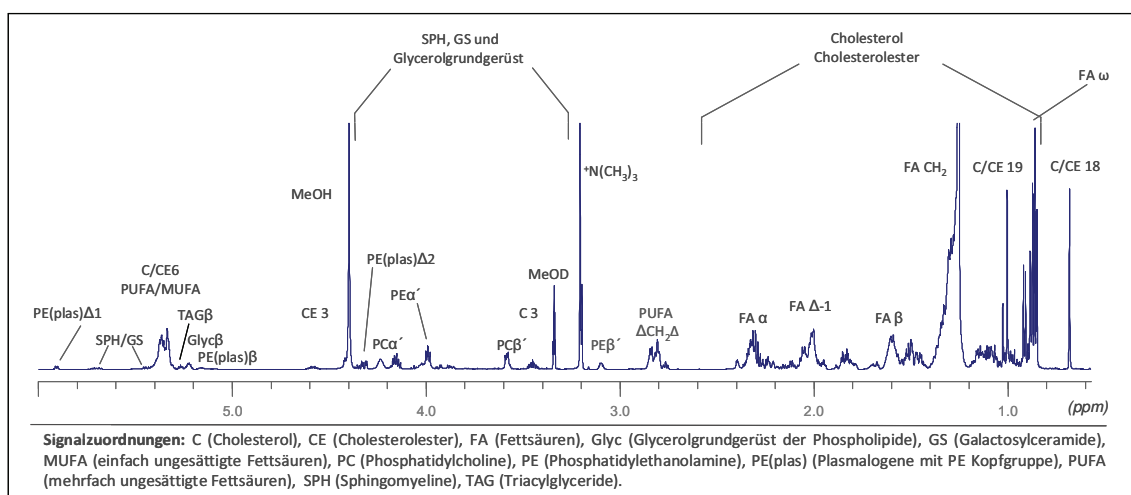


Abbildung 8: ^1H -NMR-Spektrum eines lipophilen Gewebeextrakts (Hirntumor). Die verschiedenen Lipide werden gleichzeitig in einem Experiment detektiert. Die Fläche unter den Signalen ist proportional zur Anzahl der Wasserstoffatome und zur Konzentration.

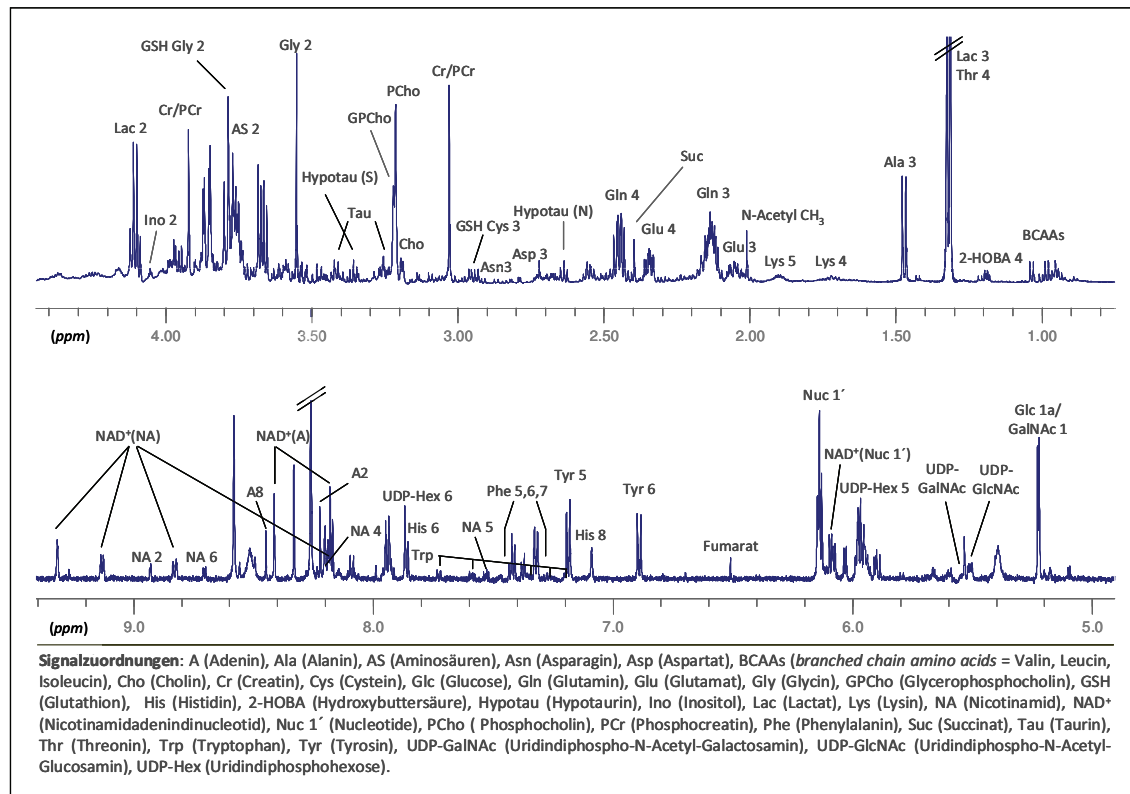


Abbildung 9: ^1H -NMR-Spektrum eines hydrophilen Gewebeextrakts (Hirntumor). Die Komplexität des Extraktspektrums aufgrund der großen Anzahl an Komponenten ist deutlich zu erkennen.

Weitere Vorteile liegen in der möglichen Strukturaufklärung unbekannter Substanzen und der großen Bandbreite an Stoffwechselprozessen, die sich der NMR-Spektroskopie erschließen. Die biochemisch relevanten Kerne ^1H , ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P sind NMR-aktiv, so dass Informationen über das Metabolitenprofil, die Stoffwechselwege (Aminosäure- oder Lipidsynthese bzw. -abbau), den Energiemetabolismus oder den pH-Wert erhalten werden.

In biologischen Flüssigkeiten und Gewebeextrakten können mittels der NMR-Spektroskopie weit über 100 Metabolite detektiert werden^[37], allein 30 – 50 Substanzen in der Cerebrospinalflüssigkeit^[36] und 37 Komponenten in *Magic Angle Spinning* (MAS) ^1H -NMR-Spektren von Glioblastomen^[38]. Auch die inzwischen erreichbaren Feldstärken bis zu 23,5 T (1 GHz) und die Entwicklung von Cryoprobenköpfen haben die Empfindlichkeit der Geräte derart gesteigert, dass nanomolare Mengen für die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums in angemessener Zeit ausreichend sind^[39].

Die ^1H -NMR-Spektroskopie eignet sich besonders für die Untersuchung des Stoffwechselstatus aufgrund der hohen Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen Kernen und der großen Anzahl detektierbarer Komponenten. Die Spektren enthalten einen „Fingerabdruck“ des untersuchten Gesundheitszustands. Dabei können die Änderungen im Zellstoffwechsel so markant sein, dass sie sich visuell erfassen lassen.

Viele ^1H -NMR-Spektren enthalten jedoch eine Vielzahl an Signalen, die zum Teil stark überlappen oder durch Rauschen überlagert werden, so dass relevante Änderungen nicht offensichtlich sind. Zudem können diese durch eine große Intraklassenvarianz verdeckt werden. Um den ganzen Informationsgehalt der Spektren zu erschließen, können Methoden der multivariaten Statistik – Mustererkennungsverfahren - eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Techniken werden für die untersuchten Probengruppen charakteristische Metabolite oder Metabolitencluster identifiziert. Ebenso ermöglichen sie mit hoher Klassifikationsgenauigkeit eine Klassenzuordnung des untersuchten Materials^[40]. Die Kopplung der NMR-Spektroskopie mit der multivariaten Statistik liefert wichtige Erkenntnisse für die Aufklärung der zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse und findet vor allem Einsatz im Bereich der *Metabonomics*⁷, in dem Veränderungen der Gesamtheit der Stoffwechselprodukte untersucht werden.

Diese Verfahren werden auch in dieser Arbeit angewandt (Abbildung 10). Hirntumorbiopsate aus verschiedenen Bereichen des Tumors (aktives Tumorgewebe, Tumorrand und entferntes Randgebiet) werden mittels einer modifizierten Dualphasenextraktion aufgeschlossen und die hydrophilen und lipophilen Extrakte NMR-spektroskopisch untersucht. Die erhaltenen Spektren werden manuell und mittels Mustererkennungsverfahren analysiert, so dass für die verschiedenen Gewebetypen charakteristische Metabolitenprofile ermittelt werden. In den folgenden Kapiteln wird näher auf die Probenvorbereitung, die Mustererkennung und die Anwendung der NMR-Spektroskopie und der multivariaten Statistik in der Analyse von Hirntumorbiopsaten eingegangen.

⁷ Definiert nach Nicholson et al. 1999^[41] als „die quantitative Messung der dynamischen multiparametrischen metabolischen Antwort lebender Systeme auf pathophysiologische Stimuli oder genetische Veränderungen.“

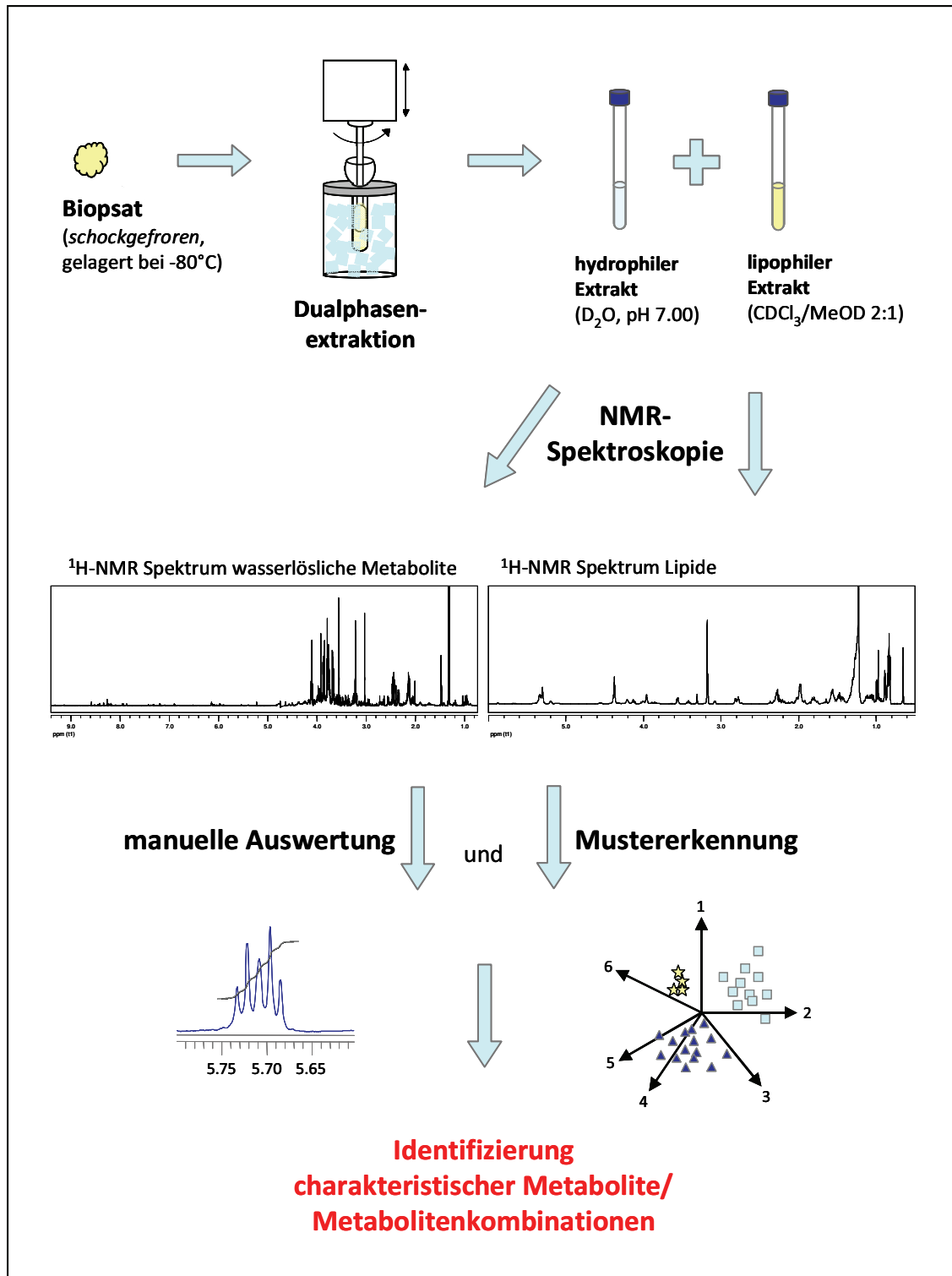


Abbildung 10: Vorgehensweise für die Ermittlung charakteristischer Metabolitenprofile.

1.4 Die Probenaufbereitung

Der Umgang mit den Proben bzw. deren Aufbereitung sind kritische Punkte in Studien an biologischem Material. Hierbei können metabolische Veränderungen auftreten, welche die pathologischen Merkmale maskieren. Gewebe, das dem Körper entnommen wird, wird nicht weiter mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und ist der Kontrolle des Körpers entzogen. Es beginnt der chemische und enzymatische Abbau^[42]. Charakteristisch für *post mortem* Reaktionen bzw. Probenischämie sind nach wenigen Minuten erhöhte Lactat-, Alanin-, GABA- (γ -Aminobuttersäure) und Glycinkonzentrationen, während der Glucosegehalt sinkt (studiert am Rattenhirn^{[43]-[45]}, Kaninchenhirn^[46] und menschlichem Cortexgewebe^[44]). Dabei steigt der GABA-Gehalt im Rattenhirn schneller an als im humanen Gewebe^[44]. Nach längerer Zeit (>1Stunde) ist ein Anstieg der Aminosäuren durch den Proteinabbau zu beobachten.

Diese Reaktionen können durch tiefe Temperaturen minimiert werden. Um die enzymatischen Prozesse zu stoppen, ist es notwendig, die Biopsate direkt nach der Resektion in flüssigem Stickstoff einzufrieren (*Schockgefrieren*) und bei -80°C bis zur Probenaufbereitung zu lagern. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, sollte darauf geachtet werden, dass die Zeit von der Entnahme bis zum Einfrieren gleich kurz gehalten wird.

Längere Lagerperioden bei -80°C beeinflussen die Metabolitkonzentrationen kaum. Jordan et al. verglichen hochaufgelöste MAS-NMR-Spektren von menschlichen Prostatabiopsaten der gleichen Patienten, die 24 h bzw. 32 Monate nach dem Einfrieren aufgenommen wurden^[47]. Sie stellten keine Unterschiede fest und schlossen daraus, dass diese unter dem Detektionslimit liegen. Lediglich das Einfrieren an sich nimmt bei MAS-NMR-Untersuchungen an intaktem Gewebe Einfluss auf das Spektrprofil. Dieses variiert bei verschiedenen Gewebetypen. Es wurden veränderte Signalintensitäten verschiedener Aminosäuren und Osmolyte (beispielsweise myo-Inositol) in der Rattenniere beobachtet^{[48],[49]}, während in der Rattenleber vor allem das Glucose-Glykogen-Verhältnis beeinflusst wurde^[49]. Ebenso wurde eine erhöhte spektrale Auflösung von Citrat und Aspartat in menschlichen Prostatabiopsaten beschrieben^[50].

Für die Isolierung der Gewebeinhaltsstoffe sind inzwischen viele Extraktionsverfahren bekannt. Die ausgewählte Technik hängt vor allem von der Fragestellung und der Analytik ab.

Folgende Bedingungen sollten die Methoden erfüllen:

- Unterbindung enzymatischer Folgereaktionen
- Hohe Extraktionseffizienz (quantitative Isolierung)
- Keine Reaktion mit den Analyten (z. B. Hydrolyse)
- geringe Streuung und gute Wiederholbarkeit

Die oben beschriebenen *post mortem* Reaktionen können auch bei der Extraktion durch die Freisetzung von Proteinen/Enzymen auftreten. Deshalb wird in der Kälte ($< 0^{\circ}\text{C}$) gearbeitet, da die Enzymaktivität bei geringen Temperaturen stark erniedrigt ist. Zudem werden die Proteine durch Fällung aus der Lösung entfernt. Sie stören außerdem in den NMR-Spektren, da sie aufgrund ihrer kurzen T_2 -Relaxationszeit sehr breite Signale hervorrufen. Die Löslichkeit der Proteine ist abhängig von pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Konzentration^[51]. Somit kann die Fällung/Denaturierung der Proteine durch unterschiedliche Strategien erreicht werden. Entweder durch Zugabe von anorganischen Säuren, organischen Lösungsmitteln, anorganischen Salzen oder Metallionen (siehe Tabelle 3)^[52].

Tabelle 3: Reagenzien zur Proteinfällung nach [52].

Klasse	Reagenz
Anorganische Säuren	Perchlorsäure (PCA) Trichloressigsäure (TCA) Wolframsäure
Organische Lösungsmittel	Aceton Acetonitril Ethanol Methanol
Anorganische Salze	Ammoniumsulfat
Metallionen	Cu-Ionen Zn-Ionen

Die Denaturierung mit Ammoniumsulfat ist jedoch ineffizient ($< 75\%$) und reversibel^[52] und die Fällung mit Metallionen für anschließende NMR-spektroskopische Analysen nicht sinnvoll.

Ein Vergleich der Ausfällungen mit anorganischen Säuren (Trichloressigsäure (TCA) und Perchlorsäure (PCA)) und organischen Lösungsmitteln anhand von Plasmaproben zeigte, dass die Fällung mit TCA am wirksamsten ist^[53]:

$\text{TCA} > \text{PCA} > \text{CH}_3\text{CN} > \text{Aceton} > \text{Ethanol} > \text{Methanol}$

Die Effizienz der Methoden hängt jedoch auch von den Proteinen ab^[51]. Zudem können die sauren Reagenzien nur bei säurestabilen Analyten eingesetzt werden. So findet bei der TCA-Fällung aufgrund der höheren Acidität schon ein Abbau des Glutamins statt. Auch Fructose-1,6-Bisphosphat, NAD(P)H (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat)) und dGTP (Desoxyguanosintriphosphat) sind säurelabil^{[39],[54]}.

Für die Isolierung der hydrophilen Metabolite aus Gewebebiopsaten oder Zellkultur werden TCA^{[55],[56]} oder häufiger PCA-Extraktionen eingesetzt^{[57]-[66]}. Dabei werden die Proben mit 5-12%iger Lösung extrahiert, wodurch die Zellwände aufgeschlossen und die Proteine denaturiert werden. Während TCA aufgrund der Flüchtigkeit durch Gefriertrocknung entfernt wird, muss PCA durch Neutralisation mit Kaliumhydroxid als Kaliumperchlorat aus der Lösung ausgefällt werden^[39]. Von Nachteil ist, dass dabei Analyten im Präzipitat eingeschlossen und mitgefällt werden können^[52]. Zudem wird ein Teil der noch vorhandenen Lipide zersetzt, wobei besonders Plasmalogene betroffen sind. Zudem wurde die Bildung von Lyso-Verbindungen beobachtet^{[67],[68]}. Trotzdem findet die Kombination von PCA und Lipidextraktion Anwendung^{[35],[69]-[72]}. Da inzwischen andere Verfahren die Möglichkeit bieten, hydrophile Stoffwechselkomponenten und Lipide simultan zu extrahieren, ist die Säure-Extraktion mit anschließender Lipidisolierung nicht zu empfehlen, auch wenn mathematische Modelle für die Korrektur von Lipidspektren entwickelt wurden^[73].

Bei der Extraktion von Lipiden müssen polare und neutrale Lipide gleichermaßen aus dem Gewebe isoliert werden. Folch et al. waren eine der Ersten, die eine Technik zur Abtrennung aller Lipide entwickelten^[74]. Das Gewebe wird mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1), welches im 20fachen Volumen zur Probe eingesetzt wird, extrahiert. Das Rohextrakt wird anschließend mit Wasser bzw. salzhaltiger Lösung aufgereinigt. Wenig später publizierten Bligh und Dyer eine modifizierte Version der Folch-Methode mit geringerem Arbeitsaufwand und Lösungsmittelverbrauch^[75]. Dabei werden die Proben mit einem dreifachen Volumen an Chloroform/Methanol (1:2) extrahiert. In zwei folgenden Schritten wird mit Chloroform und Wasser verdünnt, so dass sich ein Verhältnis von 1:1:0.5 für Chloroform, Methanol und Wasser ergibt und sich zwei Phasen ausbilden (Dualphasenextraktion). Obwohl dieses Verfahren auch eine Analyse der wasserlöslichen Bestandteile erlaubt, wurde es zunächst nur für die Isolierung von Lipiden eingesetzt. Bei Geweben mit geringem Lipidanteil (<2%), z. B. Muskelgewebe, liefern beide Methoden gleiche Gesamtlipidgehalte. Bei hohen Fettanteilen, z. B. Brustgewebe, werden mit dem Folch-Verfahren höhere Ausbeuten erzielt, da hier vor allem die Konzentration an Triacylglyceriden ansteigt^[76]. Für die Lipidanalytik von neuralem Gewebe wurden (modifizierte) Folch-Extraktionen eingesetzt (Cortexgewebe von Alzheimerpatienten^[77], Hirntumoren^[78] und intracranialen Tuberkulomen^[79]). Ebenso erfolgten Extraktionen mit erhöhtem Chloroformanteil (Chloroform/Methanol (3:1))^{[73]-[80]} oder anderen Lösungsmittelkombinationen wie Hexan/Isopropanol (3:1)^{[81],[82]}.

Mitte der Neunziger wurde von Tyagi et al. eine weitere Variante der Dualphasenextraktion eingeführt^[54]. Sie extrahierten Melanomzellen der Maus mit Chloroform, Methanol und bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:1:1.

Die wässrige Phase wurde anschließend mit Chelex aufgearbeitet und mit EDTA und Tris-Puffer für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie versetzt. Die Gehalte der phosphorhaltigen Metabolite beider Phasen korrelierten dabei gut mit PCA- bzw. Folch-Extrakten. Eine ^1H -NMR-Studie der hydrophilen Stoffwechselkomponenten aus Dualphasen- und PCA-Extraktion belegte zudem, dass erstere Methode höhere Ausbeuten liefert und die Streuung geringer ausfällt^[83]. Eine Anpassung dieser Methode für die Gewebeextraktion wurde ebenfalls entwickelt^[84]. Die Vorzüge des Verfahrens liegen in der schnelleren Aufarbeitung durch die gleichzeitige Extraktion hydrophiler und lipophiler Bestandteile. Des Weiteren wird mit milderer Bedingungen gearbeitet, der Salzgehalt ist niedriger und es ist keine Neutralisation notwendig. In verschiedenen Studien wurde die Dualphasenextraktion für die Untersuchung wasserlöslicher und lipophiler Bestandteile eingesetzt, z. B. für die Analyse des Cholinmetabolismus in Brustkrebszelllinien^[85] oder für die Charakterisierung des Metabolitenprofils von Brustkrebsbiopsaten^[84]. Ebenso wurde dieses Verfahren für die Untersuchung von Veränderungen des Metabolitenprofils nach HIF-1 α Hemmung an Darmkrebs-Xenotransplantaten^[86] und für den Vergleich des Metabolitenprofils verschiedener Lungenkarzinomzelllinien^[87] verwendet.

1.5 Mustererkennung

Computerbasierte Verfahren, mit denen aus einer komplexen Datenmenge statistische Auffälligkeiten, Regelmäßigkeiten oder Muster aufgespürt werden können, werden unter dem Begriff Mustererkennung (*pattern recognition*) zusammen gefasst. Dabei werden mit Hilfe mathematischer Algorithmen typische Charakteristika identifiziert, anhand derer eine Differenzierung in verschiedene Klassen erfolgen kann. Zudem erlauben sie eine grafische Darstellung der oft komplexen Zusammenhänge. Die Mustererkennung wird in unterschiedlichen Bereichen wie der Informatik, Statistik, Psychologie oder der analytischen/medizinischen Chemie angewandt^{[88]-[90]}.

Übertragen auf NMR-spektroskopische Datensätze mit medizinischer Fragestellung lassen sich spektrale Parameter, d. h. Metabolite oder Metabolitencluster, identifizieren, die für die untersuchten (pathologischen) Proben spezifisch sind. Die charakteristischen Profile ermöglichen eine Unterscheidung verschiedener Klassen. Ebenso erlauben sie die Zuordnung unbekannter Proben zu einer Klasse. So kann eine Differenzierung verschiedener Tumoren anhand des spektralen Musters erfolgen (s. Kapitel 1.6). Es werden zwei Techniken unterschieden:

- Bei den *unüberwachten* Verfahren (*unsupervised learning*) muss die Klassenzugehörigkeit nicht bekannt sein (vgl. Abbildung 11a). Dies hat den Vorteil, dass diese Techniken ohne Vorwissen angewandt werden können. Sie ermöglichen vor allem eine visuelle Erfassung der Daten, die häufig mit einer Dimensionalitätsreduktion⁸ verbunden ist. Es wird der gesamte Datensatz für die Identifizierung von Untergruppen anhand ähnlicher Muster herangezogen und eine Auswahl der für die Unterscheidung am besten geeigneten Variablen (in unserem Fall Metabolite oder Metabolitenkombinationen) getroffen. Beispiele für unüberwachte Techniken sind die Clusteranalyse sowie einfache Methoden zur Dimensionalitätsverminderung wie die Hauptkomponentenanalyse und die Faktoranalyse^{[89],[91]}.
- Bei den *überwachten* Lernverfahren (*supervised learning*) werden mathematische Modelle für die automatische Klassifizierung von Proben hergeleitet (vgl. Abbildung 11b). Anhand eines Trainingsdatensatzes mit bekannter Klassenzuordnung wird über einen Lernprozess ein Unterscheidungsalgorithmus (Klassifikator) entwickelt, welcher an einem Testdatensatz (ebenfalls mit bekannter Zuordnung) überprüft wird. Anschließend können über diesen Algorithmus unbekannte Fälle klassifiziert werden. Neuronale Netze können beispielsweise mit einem überwachten Lernverfahren trainiert werden.

⁸ Dabei werden multidimensionale Daten ohne signifikanten Informationsverlust in einem geringer dimensionierten Raum dargestellt, indem beispielsweise der ursprüngliche Datensatz in ein neues, reduziertes Set an Daten transformiert wird.

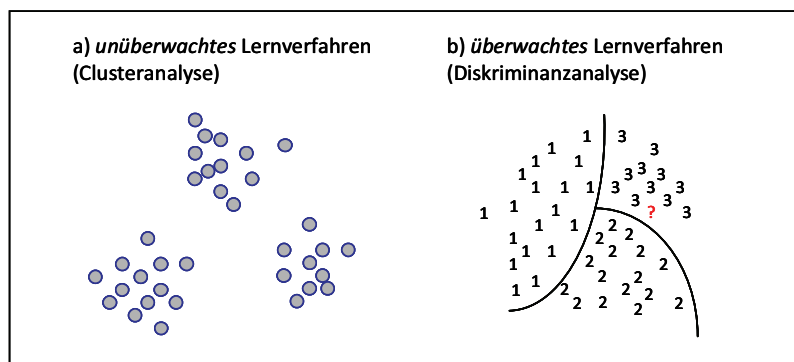


Abbildung 11: Vereinfachte Veranschaulichung der Unterschiede zwischen a) unüberwachten und b) überwachten Lernverfahren nach [89]. In a) sind die Klassen nicht bekannt, aber Gruppierungen innerhalb der Daten können ermittelt werden. In b) wird der unbekannte Fall der Klasse 3 zugeordnet.

Die Anwendung der Mustererkennung auf NMR-Datensätze umfasst zwei wesentliche Schritte: Datenvorverarbeitung sowie Klassifikation und Darstellung. Diese werden in den folgenden Abschnitten kurz beschrieben.

1.5.1 Datenvorverarbeitung

Die Datenvorverarbeitung nimmt wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Klassifikation^[91] und besteht aus zwei Schritten: der Spektrenprozessierung und der Dimensionalitätsreduktion (*feature extraction*). Erstere umfasst die Fouriertransformation (ggf. mit Apodisierung und linearer Vorhersage (*linear prediction*)), akkurate Phasen- und Basislinienkorrektur sowie die Kalibrierung des Spektrums. Zudem können in ¹H-NMR-Spektren von Gewebeextrakten durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen und durch leichte Schwankungen des pH-Werts Verschiebungen der Signale auftreten. Ebenso kann auch die Linienform unter gegebenen Umständen beeinträchtigt sein. Somit ist es sinnvoll, die Spektren einer Signalanpassung (*peak alignment*) und ggf. einer Korrektur der Linienform zu unterziehen (*line shape correction*). Dabei werden die Signale in den Spektren über einen mathematischen Algorithmus einem ausgewählten Zielspektrum angeglichen (siehe Abbildung 12).

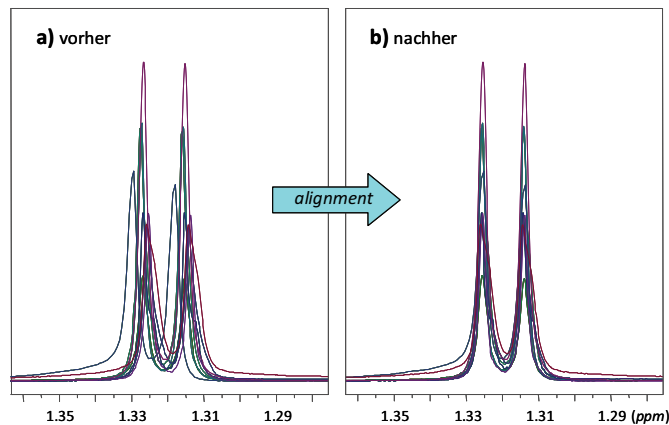


Abbildung 12: Darstellung der Signalanpassung. In a) sind die Maxima des Lactat-Dubletts deutlich gegeneinander verschoben. Nach der Signalanpassung liegen sie übereinander (b).

Ein ^1H -NMR-Spektrum beinhaltet 16k bis 64k Datenpunkte, welche in der Mustererkennung als einzelne Variablen (*Features*) aufgefasst werden. Somit kann die Klassifikation aufgrund des immensen Rechenaufwandes nicht in angemessener Zeit durchgeführt werden. Außerdem ist die Beschreibung vergleichsweise weniger Proben durch viele tausend Variablen, die zudem teilweise redundante Information beinhalten, kritisch. Die Reduktion des Datensatzes kann z. B. durch Segmentierung des Spektrums in äquidistante Intervalle von 0.01 ppm bis 0.04 ppm erreicht werden. Durch die Bildung breiterer Intervalle (bspw. 0.04 ppm), kann das oben angesprochene Problem der Signalverschiebungen vermindert werden. Andererseits kann dadurch die Zuordnung zu den entsprechenden Metaboliten erschwert werden. Um eine direkte Korrelation zwischen einzelnen Segmenten und bestimmten Signalen zu ermöglichen, können die Intervallgrenzen auch an die Signale angeglichen werden (signalangepasste Segmentierung) (siehe Abbildung 13). Hierzu müssen die Spektren zuvor ein *peak alignment* durchlaufen, danach werden die Intervallgrenzen durch die lokalen Minima gelegt. Diese Form der Segmentierung wurde auch in dieser Arbeit angewandt.

Nach der Segmentierung werden die auf das Gesamtintegral normierten Integrale oder Intensitäten der Segmente bestimmt, so dass das Spektrum als mathematischer Vektor V_S beschrieben werden kann:

$$V_S = [I_1; I_2; \dots; I_n]$$

Gleichung 1

Die Vektorkomponenten I_n stellen dabei die Integrale oder Intensitäten der Segmente 1 bis n dar. NMR-Datensätze lassen sich somit als $m \times n$ Matrix darstellen, in der m Proben in den Zeilen aufgeführt sind und n Variablen (Deskriptoren, Integrale/Intensitäten der Segmente) in den Spalten.

Es ist sinnvoll, Segmente auszuschließen, die keine Signale enthalten, von der Wasserunterdrückung betroffen sind oder Lösungsmittelsignale enthalten. Ebenso sollte bei der Untersuchung von Biopsatextrakten das Lactatsignal aufgrund seiner unsicheren Aussagespezifität herausgenommen werden^{[84],[91]}.

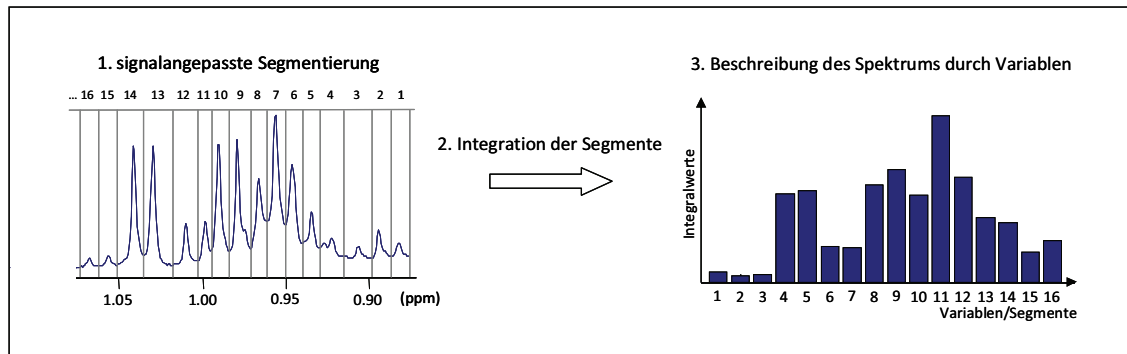


Abbildung 13: Reduktion der Spektren durch signalangepasste Segmentierung.

Die Segmentierung liefert reduzierte Datensätze, die für eine Klassifikation noch zu groß sein können. Für eine weitere Reduzierung eignen sich verschiedene Methoden, die entweder nur relevante Charakteristika auswählen (d. h. Segmente und damit Metabolite) oder die Dimensionalitätsreduktion durch Kombination verschiedener Variablen erreichen. Damit gehören diese Verfahren in den Bereich der Klassifikation und werden in dem folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.5.2 Klassifikation und Darstellung

Für die Klassifikation und Darstellung sind zahlreiche Verfahren bekannt. Die Güte einer Klassifikation wird über die Treffgenauigkeit (Korrektklassifikationsrate, Anteil der richtig klassifizierten Proben) und die Präzision (positiver Vorhersagewert) beurteilt. Ebenso dienen die Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und die Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) der Bewertung einer Methode. Bei den überwachten Lernverfahren ist die Art des Trainings entscheidend für die Qualität eines Klassifikators. Es kann vorkommen, dass das System überbestimmt wird, d. h. der Klassifikator passt sich gut an den vorhandenen Datensatz an, liefert für neue Datensätze jedoch schlechte Klassifikationsergebnisse. Dieser Verlust der Generalisierbarkeit tritt vor allem bei kleinen Datensätzen auf, beispielsweise bei seltenen pathologischen Fällen. Hier bietet sich die „*leave-n-out*“-Methode an, welche zu den Verfahren der Kreuzvalidierung zählt. Der Gesamtdatensatz der Größe k (beispielsweise Anzahl der NMR-Spektren) wird in einen Testdatensatzes der Größe n und einen Trainingsdatensatz der Größe $k-n$ aufgeteilt. Anschließend erfolgt das Training, welches so oft mit neu aufgeteilten Datensätzen wiederholt wird bis alle $k-n$ Spektren der Gewebeproben Teil des Testdatensatzes waren.

Bei sehr kleinen Datensätzen kann auch nur eine Probe zur Überprüfung eingesetzt werden. Dann erfolgen k Klassifikationsläufe, in denen immer eine andere Probe ausgeschlossen wird, während die restlichen als Trainingsset dienen. So ist es auch möglich, Ausreißer zu identifizieren.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Techniken sowie häufig in der Literatur verwendete Verfahren beschrieben.

1.5.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*) ist eine einfache und häufig angewandte Methode der multivariaten Statistik^{[89],[91]}. Hierbei wird die Varianz der Variablen für die Datenreduktion/Klassifikation herangezogen. Die korrelierten Variablen (in unserem Fall die Integrale der Spektrensegmente) werden in einen neuen (reduzierten) Datensatz an unkorrelierten Variablen transformiert. Diese werden Hauptkomponenten (*principle components*) genannt und stellen Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen dar. Dabei ergeben n Variablen n Hauptkomponenten. Die Linearkombinationen werden so gebildet, dass die erste Hauptkomponente die Segmente mit der größten Varianz in den Spektren zusammenfasst, die zweite Hauptkomponente die zweitgrößte Varianz usw. Stark korrelierte Datensätze können so ohne größeren Datenverlust durch eine geringe Anzahl der ersten Hauptkomponenten beschrieben werden, da diese den größten Teil der Varianz beinhalten. Nachfolgende Hauptkomponenten können eliminiert werden. Ebenso kann die Hauptkomponentenanalyse für die Darstellung der Daten dienen, indem 2-3 Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen werden.

Bei diesem Verfahren ist zu bedenken, dass die Hauptkomponenten aus unterschiedlichen Anteilen der Segmentintegrale zusammengesetzt sein können (beispielsweise 55% Integral A, 24% Integral B und 21% Integral C). Demnach ist eine Zuordnung zu charakteristischen Metaboliten erschwert. Zudem können Segmentintegrale relevanter Moleküle evtl. erst in späteren Hauptkomponenten auftauchen, da andere Substanzen beispielsweise aufgrund der Probenvorbereitung größere Varianzen aufweisen. Somit wird dieses Verfahren hauptsächlich zur Dimensionsreduktion eingesetzt^{[58],[92]-[96]}.

1.5.2.2 Faktor-Analyse

Die *Faktor-Analyse* ähnelt der Hauptkomponentenanalyse und wird ebenfalls zur Datenreduktion und zur Klassifikation eingesetzt^[89]. Hierfür werden jedoch die Korrelationen zwischen den Variablen verwendet, indem die Kovarianz (Maß für den Zusammenhang zweier Variablen) des Datensatzes durch verborgene Größen, die sog. *Faktoren*, beschrieben wird. Auch hier ist ein direkter Rückschluss auf die Metaboliten erschwert.

1.5.2.3 Partial Least Squares Diskriminanzanalyse

Die *Partial Least Squares Diskriminanzanalyse* (PLS-DA), oder auch *Projection to Latent Structures Diskriminanzanalyse*, gehört im Gegensatz zur Hauptkomponentenanalyse zu den überwachten Lerntechniken. Dieses Verfahren basiert auf einer PLS-Regression, bei der ein lineares Modell erstellt wird, das den Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen X und Y beschreibt. Dabei beinhaltet X die unabhängigen Variablen (NMR-Datensatz aus m Spektren und n Variablen) und Y die abhängigen Variablen (Matrix oder Vektor, der die Klassenzugehörigkeit der Proben angibt). Für die Regression werden X und Y jedoch ähnlich der Hauptkomponentenanalyse in einen weiteren Datensatz unkorrelierter Variablen transformiert. Diese so genannten „versteckten Variablen“ sind ebenfalls Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen, werden aber durch einen iterativen Prozess bestimmt, so dass die Kovarianz zwischen X und Y maximiert wird. Dabei wird die Information aus Y genutzt, um in X die Y-relevante Struktur zu finden. Somit können anhand einer PLS-Regression u. a. auch die für eine Unterscheidung verschiedener Klassen wichtigen Variablen bestimmt werden. Hierbei ist zu bedenken, dass die PLS-Regression ein lineares Modell darstellt, welches bei Datensätzen mit nicht-linearen Klassifikationsgrenzen nur begrenzt geeignet ist.

1.5.2.4 Clusteranalyse

Die *Clusteranalyse* steht für eine Vielzahl an Methoden, die gemein haben, Gruppierungen in den Datensätzen zu identifizieren^{[89],[91]}. Die einfachste Anwendung ist die Darstellung der Daten als Punktwolke. Für die Darstellung können entweder 2-3 Variablen oder die ersten Hauptkomponenten verwendet werden. Eine weitere oft angewandte Methode ist das *hierarchische Clustern* (HAC). Hier werden die Objekte (z. B. die als Punktvektoren im n dimensionalen Raum dargestellten Spektren) zunächst als einzelne Cluster aufgefasst und eine Ähnlichkeitsmatrix wird erstellt, indem für alle Cluster der Wert S_{ab} berechnet wird:

$$S_{ab} = 1 - r_{ab}/r_{\max}$$

Gleichung 2

Dabei steht r_{ab} für den Abstand zwischen zwei Clustern a und b und r_{\max} für die maximale Distanz zweier Cluster im Datensatz. Das Clusterpaar mit dem höchsten Wert in der Matrix wird zu einem Cluster gruppiert. Es folgen erneute Berechnungen und weitere Gruppierungsschritte, bis der Datensatz in einem Cluster zusammengefasst werden kann. Über Dendrogramme kann die Gruppierung dargestellt werden. Diese Methode wurde beispielsweise von Howells et al. zur Klassifizierung von Rattentumoren angewandt^[58].

1.5.2.5 Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse gehört zu den überwachten Lernverfahren. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Auffindung von Regeln, anhand derer Proben unbekannter Herkunft klassifiziert werden können. Zudem kann anhand der Verfahren ermittelt werden, welche Variablen für die Differenzierung am wichtigsten sind. Es werden *parametrische* und *nicht-parametrische* Methoden unterschieden. Während Erstere auf Annahmen zu den zugrunde liegenden Wahrscheinlichkeitsdichten basieren, erfolgt die Klassifizierung über nicht-parametrische Techniken anhand der Nachbarn. Beispiele sind die Lineare Diskriminanzanalyse (parametrisch) und das *k-nearest-neighbour*-Verfahren (nicht-parametrisch).

Die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) ist eine robuste Methode, die sowohl zur Datenreduktion als auch zur Klassifikation eingesetzt wird^{[93],[96]-[98]}. Die Trennung von Gruppen erfolgt dabei über eine sogenannte Diskriminanzfunktion, welche eine gewichtete Linearkombination der ursprünglichen Variablen darstellt^{[88],[89]}. Die Gewichtung wird so berechnet, dass die Interklassenvarianz maximal und die Intra-Klassenvarianz minimal wird. Somit wird eine optimale Klassentrennung erreicht. Für jedes Spektrum wird über die Diskriminanzfunktion ein Wert – der Diskriminanzscore – berechnet. Anhand des Abstands des Diskriminanzscores zu den Gruppenschwerpunkten erfolgt die Zuordnung. Werden mehr als zwei Gruppen unterschieden, können bei einer Menge von n Gruppen $n-1$ Diskriminanzfunktionen erstellt werden. Dabei beinhaltet die erste Funktion das größte Verhältnis zwischen Interklassen- und Intra-Klassenvarianz, die zweite Funktion das zweitgrößte Verhältnis usw.

Das *k-nearest-neighbour*-Verfahren (k-NN) ist eine Variante der *nearest-neighbour*-Techniken, die eine Zuordnung durch einen Vektorvergleich treffen. Demnach werden die Trainings- und Testspektren als Vektoren mit n Variablen im n dimensional Raum dargestellt. Die (euklidischen) Abstände zwischen Testvektor und Trainingsvektoren werden bestimmt und die Zuordnung erfolgt zu der Klasse des am nächsten liegenden Vektors. Bei der *k-nearest-neighbour*-Methode werden die k nächsten Nachbarn (in der Regel 1, 3 oder 5)^[91] zum Testvektor für die Klassifizierung herangezogen. Die Zuordnung erfolgt in die Gruppe, der die Mehrzahl an den k nächsten Vektoren angehört (siehe Abbildung 14).

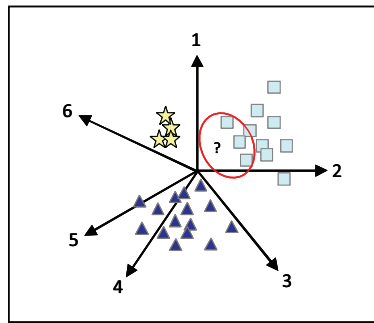


Abbildung 14: Veranschaulichung des k-nearest-neighbour-Verfahrens. Die unterschiedlichen Klassen werden durch Quadrate, Dreiecke und Sterne repräsentiert. Die unbekannte Probe würde in diesem Fall der Gruppe der Quadrate zugeordnet werden.

1.5.2.6 Künstliche Neuronale Netze

Künstliche Neuronale Netze (*artificial neural networks*, ANN) sind dem menschlichen Gehirn nachempfunden und in der Lage, selbstständig zu lernen^{[90],[99]}. Sie gliedern sich in drei Untereinheiten: eine Eingabeebene (*Input*), eine intermediäre versteckte Ebene (*hidden layer*) und eine Ausgabebene (*Output*) (siehe Abbildung 15). Jede dieser Ebenen besteht aus Knoten (Neuronen, Prozessierungseinheiten). In der Eingabeebene entspricht die Anzahl der Knoten den Variablen eines Datensatzes. Jeder Input-Knoten leitet seine Signale mit verschiedenen Gewichtungen an die Knoten der intermediären Ebene. Diese kann aus beliebig vielen Knoten bestehen, die auch in mehreren Schichten angeordnet sein können. Bei der Wahl der Anzahl an intermediären Schichten und Knoten ist zu bedenken, dass ein hoher Wert zwar den Klassifikationsfehler des Trainingsdatensatzes erniedrigt, andererseits sich aber die Klassifikation des Testdatensatzes verschlechtert.

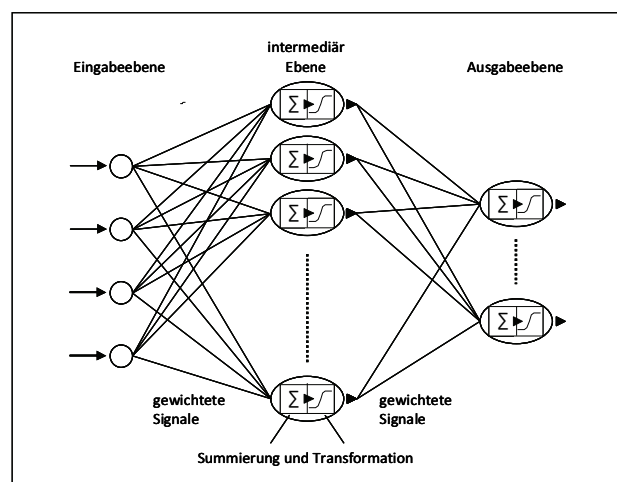


Abbildung 15: Beispiel für ein drei-schichtiges Neuronales Netz ohne Rückkopplung (nach [88]).

In der intermediären Ebene werden die eingehenden Signale aufsummiert und durch Multiplikation mit einer meist sigmoiden Funktion (Transformation) die Ausgaben berechnet, welche ebenfalls gewichtet an alle Output-Knoten weitergegeben werden. Auch in dieser Ebene erfolgt die Summierung und ggf. die Transformation der eingehenden Signale, um die Gruppenzugehörigkeit zu bestimmen. Die Anzahl der Output-Knoten entspricht dabei den zu unterscheidenden Gruppen. Das Lernen erfolgt meist über die Modifikation der Gewichtungen, wobei als Lernverfahren sowohl überwachte als auch unüberwachte Techniken eingesetzt werden. Bei Ersteren erfolgen die Gewichtungen proportional zur Differenz der ANN-Ausgabe und der erwünschten Zuordnung. Sie werden so lange modifiziert bis sie übereinstimmen. Unüberwachte Lernalgorithmen versuchen dagegen selbstständig, ähnliche Eingabesignale zu bestimmen und diese auf benachbarte Ausgabeneuronen abzubilden. ANN sind somit in der Lage spektrale Muster zu „erlernen“ und beispielsweise verschiedene Tumortypen zu unterscheiden. In vielen Studien wurden die Datensätze zunächst reduziert und anschließend über ein ANN klassifiziert^{[62],[63],[92]}.

1.5.2.7 Selbstorganisierende Karten

Selbstorganisierende Karten (*self-organizing maps*, SOM) sind vielfach angewandte Ergänzungen der ANN^[99], die aus einem einschichtigen Neuronalen Netz mit ein- bis dreidimensionaler Gitterstruktur bestehen. Sie sind den Kortexarealen der Großhirnhemisphären nachempfunden, in denen bestimmte Reizorte bestimmten Arealen zugeordnet sind. Somit obliegt benachbarten Knoten/Neuronen der SOM die Verarbeitung ähnlicher Reize (Eingabesignal). Im Folgenden wird eine erweiterte Version der SOMs vorgestellt, die auf einem überwachten Lernverfahren basiert^[100]. Hiermit ist es nicht nur möglich, jedem Neuron ein bestimmtes Eingabesignal zuzuordnen, sondern auch ein bestimmtes Ausgabesignal. Dieses Modell besteht aus einem n -dimensionalen Eingaberaum⁹, einem zweidimensionalen neuronalen Gitter (Kartenraum) und einem n -dimensionalen Ausgaberaum. Im Eingaberaum werden die Eingabevektoren (Signale, beispielsweise Vektoren der Spektren) als Punkt dargestellt, ebenso die Ausgabevektoren im Ausgaberaum. Jedem Neuron aus dem Gitter sind zwei gewichtete Vektoren zugeordnet: der Eingabegewichtsvektor und der Ausgabegewichtsvektor. Sie weisen die gleiche Anzahl an Variablen wie die Eingabe- bzw. Ausgabevektoren auf und werden ebenfalls als Punkte in den Räumen abgebildet. Damit wird bestimmt, welcher Bereich dem Neuron obliegt und die Vektoren können als „Wegweiser“ aufgefasst werden (siehe Abbildung 16a). Wird nun ein Eingabevektor eingelesen, wird das Neuron des Neuronalen Netzes „aktiviert“, dessen Gewichtsvektor den geringsten euklidischen Abstand zum Eingabevektor aufweist. Aus seinem Ausgabegewichtsvektor wird der Ausgabevektor gebildet. Der Lernvorgang erfolgt anhand von Trainingsvektoren (Eingabe- und Ausgabevektoren), welche die korrekte Abbildung von dem Eingaberaum in den Ausgaberaum repräsentieren (Abbildung 16b).

⁹ n steht dabei für die Anzahl der Variablen des Eingabevektors. Somit entspricht sie beispielsweise der Menge an Segmenten oder HKs, die der Vektor beschreibt.

Diese werden eingelesen und wie oben beschrieben wird das „zuständige“ Neuron bestimmt, das einen Ausgabevektor erzeugt. Anschließend werden nicht nur die Gewichtsvektoren des aktivierten Neurons den Trainingsvektoren angenähert, sondern auch – in vermindertem Maße - die Gewichtsvektoren topologisch benachbarter Neuronen. Nach dem Training verdichten sich die adaptierten Gewichtsvektoren an den Stellen, welche die größte Dichte der Trainingsvektoren beinhalten.

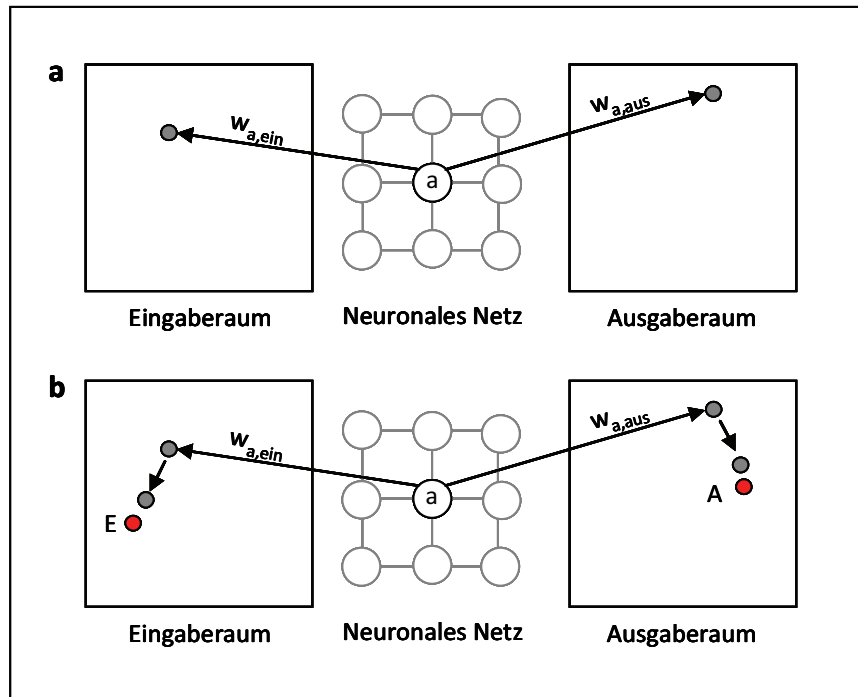


Abbildung 16: a) Aufbau einer selbstorganisierenden Karte mit den Ein- und Ausgabe-Gewichtsvektoren $w_{a,ein}$ und $w_{a,aus}$ des Neurons a. b) Lernvorgang durch Verschiebung der Gewichtsvektoren zu den vorgegebenen Ein- und Ausgabevektoren E und A (nach [100]).

1.6 NMR-Spektroskopie und Mustererkennung in der Analyse von Hirntumoren

Für die Charakterisierung von Hirntumoren kann die NMR-Spektroskopie auf verschiedene Weisen eingesetzt werden: *in vivo*, *ex vivo* oder *in vitro*¹⁰. Die hochaufgelösten Spektren der Gewebeextrakte (*in vitro*) ermöglichen dabei eine detaillierte Untersuchung der wasserlöslichen Metabolite und der Lipide. In *ex vivo* Studien werden die Biopsate dagegen direkt ohne Aufbereitung (ggf. in Pufferlösung) analysiert. Somit gleichen die Spektren den *in vivo* aufgenommenen und weisen aufgrund von Festkörper ähnlichen Strukturen ebenfalls eine geringere spektrale Auflösung auf. Die Spektrenqualität kann jedoch durch die *Magic Angle Spinning* (MAS)-Technik erheblich verbessert werden. Diese wurde Ende der 50er Jahre für die Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickelt^{[101],[102]} und 1996 von Cheng et al. in die Gewebeanalyse eingeführt^[103]. Dabei wird die Probe im „magischen Winkel“ von 54,7° zum Magnetfeld rotiert, wodurch die dipolare Kopplung beseitigt wird. Somit werden hochaufgelöste Spektren von beeindruckender Qualität erzeugt (Übersichten s. [42], [104]). Hydrophile und lipophile Komponenten können entweder gleichzeitig oder separat detektiert werden. Zur getrennten Detektion dienen T₂-gewichtete (hydrophile Metabolite) bzw. diffusionsgewichtete Sequenzen (Lipide und Proteine). Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass nur kleine Gewebemengen benötigt werden (typischerweise 2-40mg) und die Gewebestruktur für histologische Kontrolluntersuchungen erhalten bleibt^{[105],[106]}.

Schon früh wurde das Potenzial der NMR-Spektroskopie für die Untersuchung biologischer bzw. biomedizinischer Fragestellungen erkannt. In ersten Studien wurden intakte Zellen bzw. Gewebe mit ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektroskopie analysiert (¹³C: [107], ³¹P: [108],[109]). Krebszellen wurden erstmals 1977 mit ³¹P-NMR untersucht^[110]. Wenig später erfolgte die erste ¹H-NMR-Studie an intakten Leukämiezellen^[111]. Auch die NMR-spektroskopische Analyse des Gehirns und insbesondere der Hirntumoren steht schon lange im Fokus der Forschung. In frühen *in vivo* ¹H-MRS^{[112]-[114]} und *in vitro* ¹H-NMR-Untersuchungen^[115] wurden abnormale Signalveränderungen in Hirntumoren beobachtet (u. a. cholinhaltige Metabolite (tCho) und Lactat im Tumor erhöht). Es folgten zahlreiche Studien, in denen das molekulare Muster verschiedener Tumoren und gesunden Gewebes bestimmt wurde, um pathologisches Gewebe zu identifizieren und eine Unterscheidung der Entitäten bzw. Graduierungen zu ermöglichen. Im Folgenden werden diese Arbeiten für eine bessere Übersicht in Untergruppen gegliedert vorgestellt.

¹⁰ Der lateinische Begriff *in vitro* bedeutet *im Glas* und wird für Experimente verwendet, die außerhalb des lebenden Organismus in einer kontrollierten Umgebung stattfinden. In der NMR-spektroskopischen Literatur – und auch in dieser Arbeit – wird er jedoch synonym für Studien eingesetzt, die sich mit Gewebeextrakten befassen.

Gewebeextrakte (in vitro). In einer der ersten Studien wurden PCA-Extrakte von Tumorbiopsaten (Astrozytome Grad I – IV), gesundem Gewebe und kultivierten Astrozyten untersucht^[115]. Die malignen Astrozytome wiesen ein vermindertes Verhältnis von N-Acetylaspartat (NAA) zu Creatin und ein erhöhtes Verhältnis von Cholin zu Creatin auf. Gill et al. folgerten daraus, dass sich die Metabolite als ¹H-NMR-Marker einsetzen lassen^[115]. Diese Ergebnisse wurden kurze Zeit später durch eine detailliertere Studie an PCA-Extrakten von verschiedenen Hirntumoren und epileptischem Cortexgewebe belegt^[59]. In glialen Tumoren wurde ein Verlust neuronaler Marker beobachtet: NAA, GABA und das Verhältnis von Glutamat zu Glutamin waren vermindert. Die Zunahme von Glycin und Alanin bzw. die Abnahme von Succinat, Glutamat, Aspartat, Glutamin und Creatin wiesen auf eine vermehrte aerobe Glykolyse hin. Ebenso zeigten verschiedene Tumoren charakteristische Unterschiede: Taurin stieg mit der Malignität bei astrozytären Tumoren an. Meningeome grenzten sich durch erhöhte Alanin- sowie verminderte Creatin- und Inositolgehalte ab. Auch die Analyse von Gliomen im Tiermodell (Ratte, C6-Zellen) lieferte unterschiedliche Profile für Tumoren und gesundes Gewebe und bestätigte obige Beobachtungen^[116].

Es folgten verschiedene ¹H-NMR-Studien, die sich mit dem Metabolitenprofil unterschiedlicher Zelllinien (neuronale^[117] bzw. meningeale Zellen^[118]), primitiver neuroektodermaler^[119] und kindlicher^[120] Tumoren befassten. In einer anderen Untersuchung wurden die Unterschiede zwischen Meningeomen (hoher Alaningehalt), Neuroblastomen (hoher Creatingehalt) und Glioblastomen herausgearbeitet^[121]. Alanin, Glutamat, Creatin, Phosphocholin und Threonin wiesen signifikant unterschiedliche Konzentrationen auf. Usenius et al. bestimmten *in vivo* und *in vitro* die Metabolitenkonzentrationen verschiedener primärer Tumoren, darunter auch Hypophysenadenome^[122]. Während *in vivo* in allen Tumoren ein intensives tCho-Signal beobachtet wurde, konnten *in vitro* nur bei den Extrakten der Hypophysenadenome erhöhte tCho-Gehalte detektiert werden.

Ebenso wurde die Korrelation von Metaboliten mit der Malignität anhand der Astrozytomreihe untersucht^{[123],[124]}. Inositol, Alanin, Glycin und die cholinhaltigen Metabolite stiegen mit zunehmender Malignität an. Kinoshita et al. weiteten ihre Studie auf andere Hirntumoren aus^[125] und bestimmten schließlich die absoluten Konzentrationen der Metabolite^[126]. Auch die NMR-Profile von Astrozytomen, Glioblastomen, Meningeomen und ihren Rezidiven wurden analysiert^[72]. Dabei zeigten nur Astrozytom-Rezidive zu ihren vordiagnostizierten Tumoren signifikante Unterschiede. Erhöhte Werte an Alanin, Glycin, Glutamin und tCho entsprachen der für Rezidive typischen Malignisierung. Diese konnte in einigen Fällen noch vor der morphologischen Wandlung detektiert werden. Ebenso wurden Änderungen des spektralen Musters von C6-Zellen mit dem Wachstum beobachtet (Anstieg von myo-Inositol/Creatin und Abfall von Glutamin/Creatin)^[66]. In einer kürzlich erschienenen Untersuchung wurden die Unterschiede in Meningeomen verschiedener Malignität bestimmt^[127]. Danach können Creatin, Glycin und Alanin als Marker für die Graduierung und die Wahrscheinlichkeit einer Rezidivbildung eingesetzt werden.

Während sich viele *in vitro* NMR-Studien mit den hydrophilen Metaboliten befassten, ist die Anzahl der Arbeiten, die sich mit den Lipiden auseinandersetzten, gering. Teilweise wurden auch nur die Phospholipide mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht^{[128],[129]}. Einen detaillierten Überblick über den Lipidmetabolismus in Tumoren liefert F. Podo^{[130],[131]}. Die Phosphomonoester Phosphocholin und -ethanolamin (Phospholipidvorstufen) sind in Tumoren häufig erhöht.

Sonnewald et al. untersuchten sowohl hydrophile als auch lipophile Extrakte verschiedener Gliome und verglichen diese mit gesundem Gewebe sowie mit primären Astrozyten und Neuronen der Maus^[69]. Cholesterolester traten dabei ausschließlich in Glioblastomen auf. Dies wurde in späteren Studien ergänzt, in denen Cholesterolester und Triacylglyceride nicht nur in Glioblastomen, sondern auch in anderen malignen Astrozytomen mit erhöhter vaskulärer Proliferation beobachtet wurden^{[78],[132],[133]}. In einer weiteren Studie wurden anhand von D_2O -Homogenaten in Glioblastomen und Metastasen erhöhte Ölsäureanteile (18:1) der Ceramide nachgewiesen^[134]. Lehnhardt et al. detektierten zudem erhöhte Phosphocholingehalte in Lipidextrakten von Glioblastomen^[65].

Des Weiteren wurde der Informationsgehalt lipophiler und hydrophiler Extrakte auch für den Vergleich mit zuvor aufgenommenen *in-vivo*-Spektren^{[135],[136]}, für die Bestimmung von charakteristischen Profilen der Malignität^[65] und für die Unterscheidung von Gliomen und Meningeomen mittels ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie^[35] eingesetzt. Eine neuere Studie untersuchte ebenfalls mittels ^1H - und ^{31}P -NMR die Lipide in Hirntumoren, im Serum sowie in der Cerebrospinalflüssigkeit. Sowohl die Gewebeproben als auch die Körperflüssigkeiten zeigten erhöhte Phospholipid- und Cholesterolwerte^[80].

Ex vivo Studien. In den Neunziger Jahren wurden verschiedene Studien an intakten Zellen bzw. Biopsaten durchgeführt. Es wurden Zellen verschiedener kultivierter Hirntumoren untersucht. Dabei wurden Abweichungen in den Gehalten von Aspartat, Alanin, Inositol und Glutamin/Glutamat beobachtet^[137]. Über Integralverhältnisse (3.1-3.4 ppm/ 1.5-1.1 ppm) in ^1H -NMR-Spektren intakter Biopsate konnten Glioblastome von Astrozytomen und gesundem Gewebe unterschieden werden^[138]. Dies wurde einem Anstieg der Lipidresonanzen (vornehmlich Methylenprotonen der Fettsäureketten) in den Glioblastomen zugeordnet, welcher auch *in vivo* beobachtet wurde^{[139],[140]}. Auch andere *ex vivo* Studien belegten eine Akkumulation mobiler Lipide, deren Menge mit dem Ausmaß an Nekrose korrelierte^{[141]-[143]}. Zahlreiche Untersuchungen folgten, um die Lokalisierung der mobilen Lipide innerhalb der Zellen zu bestimmen^{[144]-[146]}. Es wird angenommen, dass die Lipidsignale entweder durch die Synthese von Membranmikrodomänen oder einer erhöhten Anzahl an cytoplasmatischen Lipidtröpfchen hervorgerufen werden^[147].

Kurz nach der Einführung der MAS-Technik in die Gewebeanalyse^[103] wurden von derselben Arbeitsgruppe ^1H -MAS-NMR-Spektren verschiedener Hirntumoren mit histologischen Parametern korreliert^[148]. Metabolitenverhältnisse (Metabolit/Creatin) wiesen dabei im Vergleich zu Konzentrationswerten und T_2 -Relaxationswerten für die

Unterscheidung von gesundem und neoplastischem Gewebe sowie zur Tumordifferenzierung die höchste Empfindlichkeit auf, da bei der Berechnung der Fehler und damit die Streuung geringer ausfiel. Ein Vergleich von hochaufgelösten MAS-Spektren mit *in vivo* ^1H -MRS-Spektren zeigte, dass die mit der MAS-Technik bestimmten Profile gut mit *in vivo* ^1H -MRS-Spektren übereinstimmen^[149]. Dies wurde auch in späteren Studien belegt^{[38],[106],[150],[151]}. Lediglich Stoffwechselkomponenten, die durch *post mortem* Reaktionen beeinflusst werden, können Veränderungen unterliegen^[152].

Cheng et al. untersuchten zudem die Mikroheterogenität, indem sie mehrere Proben eines Glioblastoms spektroskopisch und histologisch analysierten^[105]. Lactat und mobile Lipide korrelierten dabei mit dem Ausmaß an Nekrose. Dies wurde später durch Opstad et al. bestätigt, die den Zusammenhang zwischen mobilen Lipiden in ^1H -MAS-Spektren verschiedener Gliome (Grad II bis IV) und der Anzahl an Lipidtröpfchen, der Zelldichte und dem Nekroseanteil untersuchten^[153]. Die Lipide stiegen mit der Anzahl der Lipidtröpfchen an. Ebenso untersuchten Opstad et al. die Effekte von Probenischämie und langer Messzeit auf die Metabolitenkonzentrationen in Gliomen^[45].

In anderen Studien wurden Apoptose-induzierte Veränderungen des Metabolitenprofils im Tiermodell (Ratte, BT4C Gliome) untersucht (Anstieg der mehrfach ungesättigten Fettsäuren)^{[154],[155]}. Dies wurde auch in menschlichen Gliomen beobachtet, in denen zusätzlich Taurin mit dem Ausmaß an Apoptose korrelierte^[156]. Des Weiteren setzten Tzika et al. die Ergebnisse aus MAS- und Transkriptomanalysen zur Hirntumortypisierung ein^[157]. Auch Zellsuspensionen verschiedener Zelllinien mit unterschiedlicher Genamplifikation zeigten unterschiedliche spektrale Muster in ^1H -MAS-Spektren^[158]. Ebenso konnten durch die Untersuchung von BT4C-Zellsuspensionen typische Metabolitenprofile für bestimmte Arten von Zellstress (u. a. Zellzyklusarrest in G_1 -Phase) bestimmt werden^[159].

Righi et al. untersuchten die cholinhaltigen Metabolite in ^1H -MAS-Spektren von Gliomen und die Expression der biosynthetisch relevanten Gene^[160]. Dabei konnten niedrig maligne von malignen Gliomen durch unterschiedliche Gehalte der Phosphomono- und diester unterschieden werden, was ebenfalls durch die vermehrte Bildung der entsprechenden Gene belegt wurde. Ebenso wurde Glycin bzw. das Glycin/myo-Inositol-Verhältnis als Biomarker für die Hirntumorklassifizierung postuliert^[161]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die MAS-NMR-Spektroskopie auch zur Therapieverfolgung einsetzen lässt. Über das Konzentrationsverhältnis von myo-Inositol zu tCho konnte Tumorgewebe von Glioblastomen zu 93% von reaktiver Astrozytose¹¹ unterschieden werden^[162]. Auch die absoluten Konzentrationen der Metabolite in intaktem Gewebe verschiedener Hirntumoren eigneten sich für eine Unterscheidung^[163]. Die Untersuchung von lyophilisierten Hirntumoren mittels MAS bot dagegen keine Vorteile, vielmehr verringerte sich dadurch das Unterscheidungspotenzial^[164].

¹¹ Die Astrozytose (Gliose) beschreibt eine anomale Vermehrung der Gliazellen des ZNS, die beispielsweise durch das zerstörende Wachstum des Tumors oder durch die Therapie induziert werden kann.

Ebenso wurde die *in-vivo-Spektroskopie* für die Analyse von Hirntumoren intensiv eingesetzt, so dass ein großer Bestand an veröffentlichten Studien vorhanden ist. Eine detaillierte Übersicht zu frühen *in-vivo*-Studien von Tumoren liefert Negendank^[165]. Seitdem sind weitere Übersichtsartikel erschienen, in denen der Einsatz der MRS in der Charakterisierung von Hirntumoren^{[166]-[168]} und die klinische Anwendung^{[169]-[172]} beschrieben sind. Ebenso wurden technische Aspekte und Methoden^[173] sowie Multivoxel-MRS-Studien^[174] zusammengefasst.

Mustererkennung. Mustererkennungsverfahren wurden erstmals zu Beginn der 90er Jahre auf hochaufgelöste Spektren im biomedizinischen Bereich angewandt^[175]. Kurze Zeit später folgte die erste Klassifizierung von gesundem Gewebe (Leber, Niere, Milz) und fünf Rattentumoren (PCA-Extrakte) über eine Hauptkomponenten- und anschließende Clusteranalyse^[58]. Es konnten die Tumoren von gesundem Gewebe und die verschiedenen Tumorentitäten unterschieden werden. Anhand des gleichen Datensatzes entwickelten die Autoren zudem einen Klassifizierungsalgorithmus bestehend aus Hauptkomponentenanalyse, Clusteranalyse und einem ANN^[92]. Auch Maxwell et al. klassifizierten PCA-Extrakte verschiedener Hirntumoren^[63]. Sie reduzierten die Daten mittels einer Hauptkomponentenanalyse und die ersten 30 Hauptkomponenten wurden in ein neuronales Netz eingelesen. Damit erreichten sie eine Unterscheidung von Meningeomen und Nicht-Meningeomen zu 85%. Gliome konnten dagegen nur zu 62% zu dem richtigen WHO-Grad zugeordnet werden. In einer weiteren Studie wurden verschiedene Hirntumoren (PCA-Extrakte) über Genetisches Programmieren bzw. über ANN unterschieden und die Ergebnisse verglichen^[62]. Beide Verfahren konnten erfolgreich Meningeome von Nicht-Meningeomen trennen (90% wurden richtig zugeordnet). Lisboa et al. verglichen dagegen ANN mit statistischen Methoden (LDA, k-NN, Hauptkomponentenanalyse und PLS) anhand von Rattentumoren und normalem Gewebe (PCA-Extrakte)^[176]. Nadal et al. versuchten über HAC ³¹P- und ¹H-NMR-Spektren von hydrophilen und lipophilen Extrakten zu klassifizieren^[35]. Dabei ließen jedoch nur die ¹H-NMR-Spektren der hydrophilen Bestandteile eine Unterscheidung von Glioblastomen und Meningeomen zu. In einer neueren ³¹P-NMR-Studie konnten dagegen verschiedene Hirntumoren über ihr Phospholipidprofil unterschieden werden^[177]. Über eine LDA wurde gesundes Gewebe zu 100% korrekt eingestuft, während 89% der Meningeome, 75% der Metastasen und 57% der malignen Astrozytome richtig klassifiziert wurden.

Mitte der 90er Jahre entwickelten Somorjai et al. eine robuste Klassifizierungsstrategie über die Kombination von LDA und ANN^[93]. Diese wendeten sie auf ¹H-NMR-Spektren von Biopsaten (95 Meningeome, 74 Astrozytome und 37 Epilepsiegewebe) an und erreichten eine Klassifizierungsgenauigkeit für die Unterscheidung der drei Gruppen von knapp 92%^[94]. Ebenso kam eine Kombination von PLS und Diskrimanzanalyse für die Unterscheidung verschiedener Hirntumoren (niedrig maligne und maligne Gliome, nicht gliale Tumoren und Metastasen) zum Einsatz. GABA, Acetoacetat, Alanin, Creatin, Glutamat und Glutamin sowie Glycin, myo-Inositol, NAA und tCho waren - wie in älteren Untersuchungen auch - relevante Metabolite^[178].

In weiteren Studien wurde die multivariate Statistik auf MAS-NMR-Spektren angewandt. Griffin et al. unterschieden drei neuronale Zelltypen mittels Hauptkomponentenanalyse^[179]. Pouillet et al. entwickelten ein Klassifizierungsprotokoll für die Diagnose von Hirntumoren anhand von ¹H-MAS-Daten^[180]. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit einer automatischen Peakintegration und einer *least squares-support vector machine* als Klassifizierungsverfahren erreicht. Gliome (Grad II und III), Glioblastome, Metastasen und Meningeome wurden mit einer Klassifikationsgenauigkeit von über 90% unterschieden. In anderen Studien wurden Oligodendrogliome unterschiedlicher Malignität^[181], Hirnmetastasen^[182] und pediatriische Tumoren^[183] charakterisiert. Andronesi et al. klassifizierten dagegen verschiedene Hirntumoren unter Verwendung von zweidimensionalen MAS-Spektren^[184].

Auch *in vivo* wurden die verschiedenen Hirntumoren mittels Mustererkennungsverfahren unterschieden. Usenius et al. wendeten ANN auf *in-vivo*-MRS-Spektren an^[185]. Sie erreichten eine Klassifikationsgenauigkeit von 82% für die Unterscheidung von neoplastischem und gesundem Gewebe. Zudem konnten gutartige von bösartigen Gliomen und anderen Hirntumoren differenziert werden. Auch Poptani et al. klassifizierten *in vivo* ¹H-MRS-Spektren von gutartigen und bösartigen Gliomen (73% bzw. 98% Sensitivität), Abszessen (88%) und Tuberkulomen (89%) über ANN^[186]. Ebenso wurden LDA^{[187]-[190]} bzw. Hauptkomponenten- und Clusteranalyse^[95] zur Differenzierung verschiedener Tumoren eingesetzt. In anderen Studien wurden Mustererkennungsverfahren auf ¹H-MRSI-Daten (*Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging*) zur Tumorcharakterisierung angewandt^{[98],[191]-[193]}. Im Rahmen eines europäischen Projekts (eTUMOR) wird zudem an einem automatisierten Entscheidungshilfesystem – basierend auf Mustererkennungsverfahren – für die Hirntumordiagnose anhand von *in vivo* ¹H-MRS-Daten gearbeitet^[194].

Die *in-vitro*-, *ex-vivo*- und *in-vivo*-Studien zeigen, dass Hirntumoren ein charakteristisches Profil aufweisen. Dabei treten Veränderungen in mehreren Stoffwechselkomponenten auf. Die wichtigsten betreffen Alanin, Glycin, Glutamat/Glutamin, Inositol, die cholinhaltigen Metabolite und die mobilen Lipide sowie Lactat (nur *in vivo*!). Zu gesundem Gewebe ist die Differenzierung in der Regel eindeutig, während sich die Unterscheidung bestimmter Tumortypen noch als problematisch erweist. Die genaue Charakterisierung des Randgebiets der Tumoren stand bisher weniger im Fokus der Forschung. In einer kürzlich erschienenen MAS-Studie wurden unterschiedliche Bereiche der Tumoren näher analysiert (nekrotischer Teil, aktiver Kern und Randgebiet)^[195]. Anstelle des gesamten Spektrums wurden allerdings nur die Lipide, NAA, Creatin und die cholinhaltigen Metabolite für eine statistische Analyse herangezogen. Des Weiteren konzentrierte sich eine Arbeit auf den Energiemetabolismus und den oxidativen Stress im Tumorzentrum und im Randgebiet in niedrig malignen Gliomen^[196]. Dabei wurden jedoch nur Lactat, Pyruvat und Glucose sowie die entsprechenden Enzymaktivitäten (Hexokinase, Lactatdehydrogenase und Pyruvatkinase) spektralphotometrisch bestimmt. Auch in einigen *in-vivo*-Studien erfolgte eine Untersuchung der Tumorperipherie anhand von Änderungen des Cholingehalts bzw. des Cholin/NAA-Verhältnisses^{[197],[198]}.

Wright et al. unterzogen dagegen ^1H -MRSI-Spektren von Gliomen einer ICA (*independent component analysis*) und bestimmten daraus verschiedene Bereiche (Tumorkern, infiltrative Zone und gesundes Gewebe)^[199]. Eine detaillierte Untersuchung aller Metabolite anhand von Extrakten erfolgte bisher nicht. Charakteristische Gesamtprofile oder Metabolitencluster, die zur Abgrenzung des Tumorrandgebiets beitragen können, wurden ebenfalls bislang nicht untersucht. Ebenso wenig erfolgte eine detaillierte NMR-spektroskopische Analyse der Lipide in unterschiedlichen Bereichen der Tumoren.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Wahl eines geeigneten Extraktionsverfahrens

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Eignung der in dieser Arbeitsgruppe angewandten Extraktionsverfahren untersucht: die PCA-Extraktion mit anschließender Isolierung der lipophilen Bestandteile^[70] und die Dualphasen-Extraktion^[84]. Dabei wurde erstere Methode an Gewebeproben angepasst, da das Verfahren ursprünglich für Zellextrakte entwickelt wurde. Als Probenmaterial wurde Gehirngewebe vom Schwein verwendet. Dieses ähnelt in seiner Zusammensetzung den Stoffwechselkomponenten des menschlichen Gehirns und ist somit gut für Überprüfungen und Entwicklungen von Methoden geeignet. Für den Vergleich der beiden Verfahren und die folgenden Untersuchungen wurden jeweils größere Mengen an Schweinehirn unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend portioniert. Die Signalzuordnung in den ¹H-NMR-Spektren der hydrophilen und lipophilen Extrakte erfolgte über verschiedene 2D NMR-Experimente, Messungen von Referenzsubstanzen und den Abgleich mit Literaturwerten^{[61],[70],[200],[201]}.

Der Vergleich beider Techniken bestätigte, dass die Dualphasenextraktion der PCA-Extraktion mit anschließender Lipidisolierung vorzuziehen ist (vgl. 1.4). Die hydrophilen Extrakte zeigten zwar keine qualitativen Unterschiede, die Dualphasenextrakte wiesen jedoch höhere Gehalte auf. Zudem werden zytosolische und membranassoziierte Bestandteile in einem Schritt unter milden Bedingungen extrahiert, so dass das Lipidprofil nicht beeinflusst wird. In den Lipidextrakten nach Henke^[70] wurden dagegen die in der Literatur beschriebene Abnahme an Plasmalogenen und die Bildung von Lyso-Verbindungen beobachtet^{[67],[68]}. Andererseits wurden in einigen hydrophilen Dualphasenextrakten sehr breite Signale detektiert, die auf rückständige Proteine schließen ließen. Somit werden die Proteine bei der Dualphasenextraktion nicht immer vollständig ausgefällt. Dies wurde auch von Le Belle et al. bestätigt, die einen signifikant höheren Proteingehalt in PCA-Pellets gegenüber Methanol/Chloroform-Pellets detektierten^[83].

Des Weiteren wurde untersucht, wie viele Extraktionsschritte für eine quantitative Isolierung notwendig sind. Dafür wurde jede Gewebeprobe dreimal extrahiert. Zudem wurden unterschiedliche Mengen (240 mg bis 550 mg) eingesetzt, um auch bei größeren Proben eine vollständige Isolierung zu gewährleisten. Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen Einwaagen keinen Einfluss auf das Extraktionsergebnis haben. Während 98% der wasserlöslichen Metabolite im ersten Schritt extrahiert wurden und knapp 2% im zweiten Schritt, wurden bei den Lipiden im ersten Schritt nur 75% isoliert und im zweiten Schritt 24%. Sowohl in den hydrophilen als auch in den lipophilen ¹H-NMR-Spektren der dritten Extraktion wurden weniger als 1% der Komponenten identifiziert. Demnach sind zwei Extraktionsschritte ausreichend.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Dualphasenextraktion erweitert. Das bei der Extraktion verbleibende Pellet wird nochmals mit Chloroform und Methanol (1:1) extrahiert und anschließend wird mit PCA extrahiert.

Die entsprechenden Fraktionen werden zusammen gegeben. Dieses Vorgehen vereint die Vorteile beider Methoden: Es können wasserlösliche Metabolite und Lipide simultan ohne Nebenreaktionen extrahiert werden. Durch die zwei anschließenden Schritte ist eine quantitative Extraktion gewährleistet. Zudem werden durch die Vereinigung des wässrigen und des PCA-sauren Extrakts noch vorhandene Proteine ausgefällt, da die Fällungseffizienz von PCA größer ist als von Methanol^[53]. Zudem inaktiviert PCA alle Enzyme, während durch Methanol bspw. die Lactatdehydrogenase (LDH) nur unvollständig inaktiviert wird. Da die PCA-Extraktion im letzten Schritt durchgeführt wird, findet die Extraktion des Großteils der Komponenten unter milden Bedingungen statt. Daneben sollte die mögliche Mitfällung der Analyten durch die anschließende Ausfällung der PCA als Kaliumperchlorat geringer sein, da weniger an PCA eingesetzt wird.

Um die weiterentwickelte Methode zu überprüfen, wurde diese mit den beiden anderen Prozeduren verglichen. Dafür wurden die bekannten Methoden angepasst (s. Kapitel 5.1) und jeweils vier Proben pro Verfahren aufgearbeitet. In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind beispielhaft die lipophilen bzw. hydrophilen ¹H-NMR-Spektren der verschiedenen Extraktionsmethoden dargestellt.

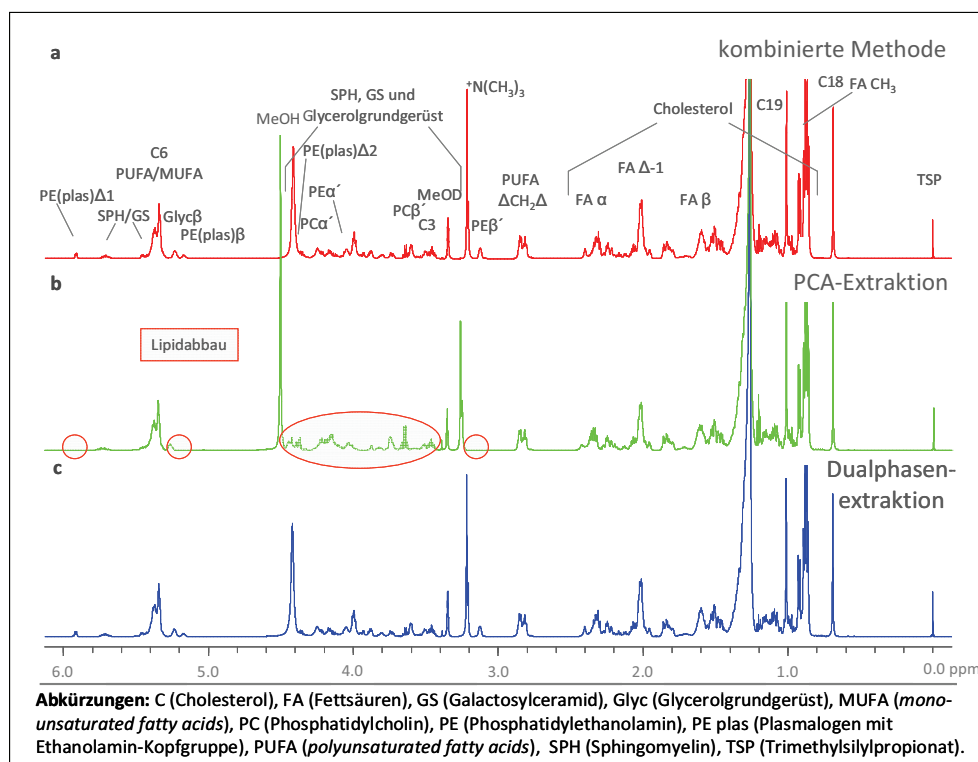


Abbildung 17: ¹H-NMR-Spektren der Lipidextrakte, die über drei verschiedene Techniken - a) kombinierte Methode, b) PCA-Extraktion, c) Dualphasenextraktion - erstellt wurden. Die Zuordnungen zu den funktionellen Gruppen der Lipide sind dem Anhang zu entnehmen.

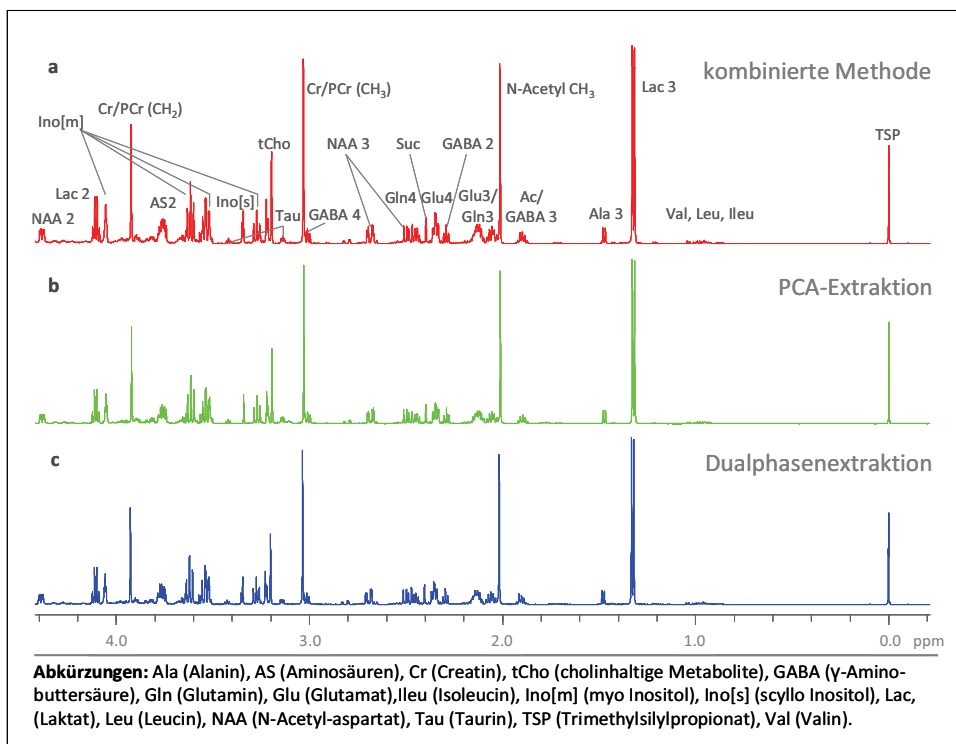


Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektren der wasserlöslichen Metabolite, die über drei verschiedene Techniken - a) kombinierte Methode, b) PCA-Extraktion, c) Dualphasenextraktion - erstellt wurden.

Alle drei Verfahren lieferten reproduzierbare Ergebnisse. Während sich, wie zu erwarten, die Lipid-Spektren der Dualphasenextraktion und der kombinierten Methode nicht unterschieden, war der Lipidabbau durch die vorgeschaltete PCA-Extraktion deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 17b). Zudem wiesen die lipophilen Extrakte nach Henke größere Integrale der Cholinkopfgruppe auf.

Mit der kombinierten Methode wurden bei den hydrophilen Extrakten die höchsten Ausbeuten erreicht (siehe Tabelle 4). Nur scyllo-Inositol und Taurin wiesen in den Dualphasenextrakten höhere Konzentrationen auf. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) wurden zwischen der kombinierten Methode und der PCA- bzw. Dualphasenextraktion für Lactat, Aspartat, scyllo- und myo-Inositol sowie NAA beobachtet. Die höheren Lactatwerte der kombinierten Methode könnten ein Hinweis auf eine unvollständige Enzyminaktivierung sein (s. o.). Andere für *post mortem* Reaktionen charakteristische Metabolite wie Alanin, GABA und Glycin sind jedoch nicht signifikant erhöht (vgl. Kapitel 1.4).

Die Streuung der Metabolitkonzentrationen war bei allen drei Verfahren gering. Dabei wies die Dualphasenextraktion die geringste Streuung auf. Die größere Varianz der beiden anderen Prozeduren kann durch die Ausfällung der PCA als Perchlorat hervorgerufen werden. Dabei erfolgt in geringem Ausmaß eine zufällige Mitfällung der Analyten, so dass die Gehalte in den Proben stärker streuen. Bei der kombinierten Methode fällt die Varianz geringer aus, da hier nur ein Drittel der PCA-Menge im Vergleich zur PCA-Extraktion eingesetzt wurde.

Somit stellt die kombinierte Methode ein effizientes Extraktionsverfahren dar, das eine quantitative Isolierung der Analyten unter schonenden Bedingungen ermöglicht und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Der Arbeitsaufwand ist aufgrund der weiteren Schritte und der anfallenden Neutralisation geringfügig größer als bei der Dualphasenextraktion. Wichtiger erachtet wurden jedoch die quantitative Isolierung der Analyten und die vollständige Inaktivierung der Enzyme. Zudem erleichtert die Neutralisation der hydrophilen Extrakte vor der Gefriertrocknung die pH-Wert-Einstellung vor der NMR-spektroskopischen Analyse, da die Proben somit schon annähernd den richtigen pH-Wert aufweisen. Deshalb wird die weiterentwickelte Methode für die Gewebeextraktion der Tumorbiosate eingesetzt.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Metabolitkonzentrationen (Schweinehirn) in $\mu\text{mol/g}$ Nassgewicht (Mittelwert \pm Standardabweichung) der verschiedenen Extraktionsverfahren. Metabolite mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen sind Fett hervorgehoben.

Metabolite [$\mu\text{mol/g}$]	PCA- Extraktion (n = 4)	Dual- phasen- extraktio n (n = 4)	Kombiniert e Methode (n = 4)	p-Werte PCA vs kombinierte Methode	p-Werte CMB vs kombinierte Methode
Lactat	123.5 \pm 11.0	129.4 \pm 3.6	138.4 \pm 4.4	0.0413	0.0265
Alanin	11.5 \pm 0.9	11.7 \pm 0.6	12.2 \pm 0.7	0.1448	0.2021
N-Acetyl (CH₃)	59.6 \pm 5.1	62.0 \pm 1.3	65.4 \pm 2.3	0.0649	0.0448
Glutamin	73.0 \pm 6.1	73.5 \pm 2.3	77.3 \pm 3.6	0.1653	0.0995
GABA	21.0 \pm 1.8	21.5 \pm 0.3	22.5 \pm 0.8	0.1267	0.0515
Glutamat	62.5 \pm 5.5	66.2 \pm 0.8	68.9 \pm 3.4	0.0701	0.1322
Succinat	7.5 \pm 0.6	6.9 \pm 0.8	7.7 \pm 0.5	0.3305	0.0733
Aspartat	12.8 \pm 1.2	14.4 \pm 0.4	14.8 \pm 1.0	0.0340	0.2797
scyllo-Inositol	5.6 \pm 0.5	13.6 \pm 1.3	8.6 \pm 0.8	0.0029	0.0210
Taurin	6.2 \pm 0.4	7.1 \pm 0.3	6.8 \pm 0.6	0.1083	0.2198
Creatin/Phospho- creatin	63.1 \pm 4.9	65.7 \pm 2.5	67.9 \pm 6.8	0.1600	0.3127
myo-Inositol	89.7 \pm 6.7	91.8 \pm 3.4	99.2 \pm 2.0	0.0342	0.0155
N-Acetylaspartat	57.9 \pm 5.2	61.2 \pm 4.8	67.5 \pm 4.0	0.0234	0.0795
Cholinhaltige Metabolite	20.3 \pm 1.7	20.2 \pm 0.5	20.8 \pm 1.5	0.3674	0.2986

2.2 Manuelle Auswertung

Die Bestimmung spezifischer Metabolitenprofile mit Hilfe der multivariaten Statistik erfordert eine große Anzahl an Proben. Deshalb ist die Mustererkennung nicht immer zur Analyse geeignet. Bei selten auftretenden Krankheiten ist es häufig nicht möglich, genügend Proben zu untersuchen. Dies trifft auch in der vorliegenden Arbeit auf einige Tumorentitäten zu. Neben den malignen astrozytären Tumoren wurden zudem ein Kraniopharyngeom und ein Hypophysenadenom analysiert. Hier bietet sich eine manuelle Auswertung an, um Unterschiede zu erarbeiten.

Daneben kann es vorkommen, dass gering konzentrierte Metabolite, deren Signale im 1D ^1H -NMR-Spektrum überlagert sind, durch die Mustererkennung nicht erfasst werden. Daher werden in den folgenden Abschnitten kurz die identifizierten Metabolite der hydrophilen und lipophilen Extrakte beschrieben und beobachtete Besonderheiten in den NMR-Spektren erläutert (Abschnitt 2.2.1). Zudem werden die verschiedenen Tumorentitäten untereinander verglichen, um Unterschiede innerhalb der Gliome herauszuarbeiten und diese den nicht-glialen Tumoren gegenüber zu stellen (Abschnitt 2.2.3).

2.2.1 Signalzuordnungen und Besonderheiten in den ^1H -NMR-Spektren

Die Identifizierung der Komponenten in den Hirntumorextrakten basierte auf den vorhergehenden Analysen des Schweinehirns. Zudem wurden die Signalzuordnungen auch hier über 2D NMR-Experimente abgesichert. Die hydrophilen Extrakte enthalten die wasserlöslichen intra- und extrazellulären Metabolite. Insgesamt wurden über 50 Substanzen identifiziert. Diese sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Identifizierte Metabolite in den hydrophilen Extrakten.

Acetat	Fumarat	2-Hydroxybuttersäure	N-Acetylaspartat	Succinat
Adenin	Glucose	2-Hydroxyglutarat	N-Acetylgalactosamin	Taurin
Alanin	Glutamat	Hypotaurin	Nicotinamid	Threonin
γ -Aminobuttersäure	Glutamin	Myo-Inositol	Nicotinamid-dinukleotid	Tryptophan
Arginin	ox. Glutathion	Scyllo-Inositol	Nucleotide	Tyrosin
Asparagin	red. Glutathion	Isoleucin	Phenylalanin	Uridin-diphosphogalactose
Aspartat	Glycerophosphocholin	Lactat	Phosphocholin	Uridin-diphosphoglucose
Carnitin	Glycerophosphoethanolamin	Leucin	Phosphocreatin	Uridin-diphospho-N-Acetylgalactosamin
Cholin	Glycin	Lysin	Phosphoethanolamin	Uridin-diphospho-N-Acetylglucosamin
Creatin	Glykogen	Methionin	Prolin	
Cystein	Histidin	N-Acetyl CH_3	Serin	

Lactat, Alanin, Glutamin und Glutamat, Succinat, Inositol, Glycin, Creatin/Phosphocreatin und die cholinhaltigen Metabolite sind die Hauptkomponenten (vgl. Abbildung 9). Ferner wurden in allen Extrakten Valin, Leucin und Isoleucin (*branched chain amino acids*, BCAAs) detektiert und von den aromatischen Aminosäuren in der Regel Histidin, Phenylalanin und Tyrosin, während Tryptophan nur in konzentrierten Extrakten identifiziert wurde. Phosphocreatin wird während der Entnahme des Gewebes schon zu Creatin abgebaut, weshalb in den ^1H -NMR-Spektren das Creatinsignal den Gehalt beider Komponenten wiedergibt^[123]. Zudem wurde in einigen Extrakten Mannitol beobachtet. Es wird bei der Kraniotomie eingesetzt, um eine cerebrale Dekompression zu gewährleisten^[59] bzw. die Bildung von Ödemen zu vermeiden^[62]. Für die statistische Analyse werden deshalb die Mannitolresonanzen zwischen 3.63 ppm und 3.88 ppm herausgenommen.

Lipidextrakte enthalten vornehmlich membranassoziierte Lipide sowie Spezies aus cytoplasmatischen Lipidtröpfchen, die durch den Extraktionsvorgang aufgeschlossen werden. Ihre Zusammensetzung variiert je nach Gewebeart. Hauptbestandteile der neuronalen Gewebeextrakte sind Cholesterol (C) und verschiedene Phospholipide (vgl. Abbildung 8), darunter Phosphatidylcholine (PC) und -ethanolamine (PE), Plasmalogene und Sphingomyeline (SPH) sowie Galactosylceramide/Sulfatide¹² (GS). Ebenso wurden Cholesterolester (CE), Triacylglyceride (TAG) und Diacylglyceride (DAG) in den Extrakten der Tumorzentren und der Randgebiete identifiziert. Neben gesättigten und ungesättigten Fettsäuren¹³, darunter sowohl MUFAs als auch PUFAs, wurden ebenfalls α -Hydroxyfettsäuren detektiert. Zudem ist innerhalb der Fettsäuren der Anteil von MUFA/PUFA, ω -3 Fettsäuren sowie Arachidon- und Linolsäure unterscheidbar^[201].

Im Vergleich zu den hydrophilen Extrakten sind die Lipidspektren weniger komplex und erlauben damit eine einfachere visuelle Erfassung von Unterschieden. So fiel auf, dass die drei Gewebearten (aktives Tumorzentrum, Randgebiet und entferntes Randgebiet) unterschiedliche Sphingolipidgehalte aufwiesen. Das Verhältnis von Galactosylceramiden/Sulfatiden zu SPH kann anhand der olefinischen ϵ -Protonen (Zuordnung siehe Anhang) bestimmt werden. Diese spalten jeweils in ein Dublett von Triplets auf, allerdings mit unterschiedlicher Verschiebung (Abbildung 19b). Bei den Galactosylceramiden und Sulfatiden (im Folgenden als GS zusammengefasst) erfolgt eine leichte Hochfeld- bzw. Tieffeldverschiebung des Signals im Vergleich zum SPH. Liegen sowohl SPH als auch GS vor, ist ein breites Multiplett zu erkennen. Anhand der Peakintensitäten des Multipletts kann das Verhältnis beider Lipide bestimmt werden. Dieses unterscheidet sich signifikant zwischen Tumorzentrum, Randgebiet und entferntem Randgebiet (Abbildung 19a). In den entfernten Randgebieten lag ein vergleichsweise hohes Verhältnis von GS zu SPH vor (3.33 ± 0.22).

¹² Sulfatide sind Sulfatderivate der Galactosylceramide, die vornehmlich an der 3-Position im Galactosering verestert sind.

¹³ Es ist anzumerken, dass es sich bei den Fettsäuren vorwiegend um gebundene Fettsäurereste handelt. Der Anteil an freien Fettsäuren im Gewebe ist nur sehr gering.

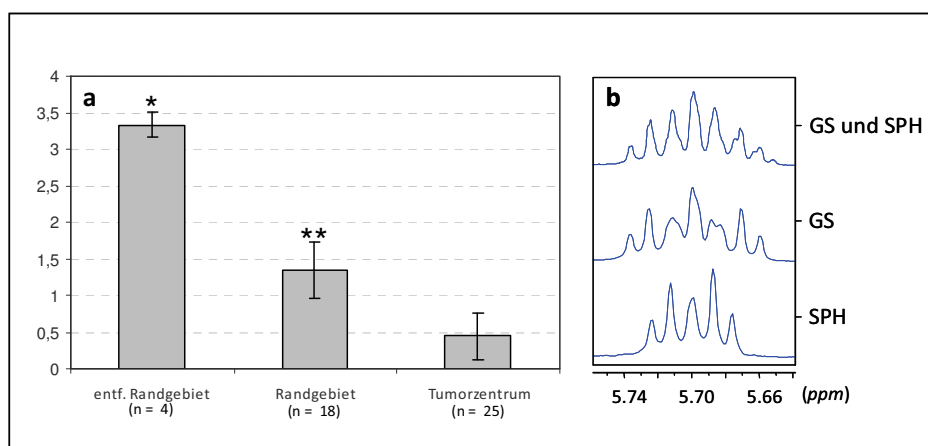


Abbildung 19: a) GS-zu-SPH-Verhältnisse in den verschiedenen Tumorregionen. Die Signifikanz ist in Bezug zum Tumorzentrum angegeben (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). b) Multipletts der ϵ -Protonen von SPH und GS im Gemisch und als Einzelkomponenten. Das Signal der GS unterscheidet sich von den SPH, da hier zwei Verbindungen (Galactosylceramide und Sulfatide) vorliegen und die Multipletts überlagern.

Dagegen wurden GS in achtzehn Tumorzentren nicht oder nur in geringer Konzentration detektiert, während sieben Tumorzentren leicht erhöhte Mengen enthielten, so dass ein mittleres Verhältnis von $0,44 \pm 0,31$ ermittelt wurde. Eine Korrelation mit einer bestimmten Tumorentität bei den leicht erhöhten Verhältnissen wurde dabei nicht beobachtet. Sie könnten jedoch auf ein stark infiltratives Wachstum hinweisen. Die Spektren des Tumorrandgebiets enthielten sehr variable Verhältnisse von GS zu SPH ($1,35 \pm 0,38$) und spiegelten somit unterschiedliche Anteile von gesunden und neoplastischen Zellen wider. So wurde in drei Spektren kein GS detektiert, in fünf Spektren nur verminderte Mengen und in zehn Spektren lag der GS-Gehalt bei den Werten des entfernten Randgebiets. In Abbildung 20 sind Spektrenausschnitte des olefinischen Bereichs dargestellt. Die unterschiedlichen Verhältnisse von GS zu SPH sind deutlich anhand der ϵ -Protonen zu erkennen.

In der Literatur sind unterschiedliche Angaben zu den GS-Gehalten in Hirntumoren zu finden. Jennemann et al. identifizierten GS nur in gutartigen Astrozytomen und beobachteten wie in dieser Studie keine GS in malignen Astrozytomen^[202]. In einer anderen Studie wurden dagegen auch in malignen Astrozytomen GS detektiert^[203]. Die Autoren gaben keine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse. Im Tiermodell (implantierte C6-Zellen in Rattenhirn) wurden wiederum geringere GS-Gehalte im Tumor im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet^[204]. Hier wurden Gewebeschnitte der Tumoren über Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie analysiert. Dabei ist zu bedenken, dass die Gewebeschnitte nur einen 2D-Ausschnitt des Tumors repräsentieren. Somit ist ein Vergleich schwierig. In bisherigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen von primären Hirntumoren wurden zu GS keine Angaben gemacht.

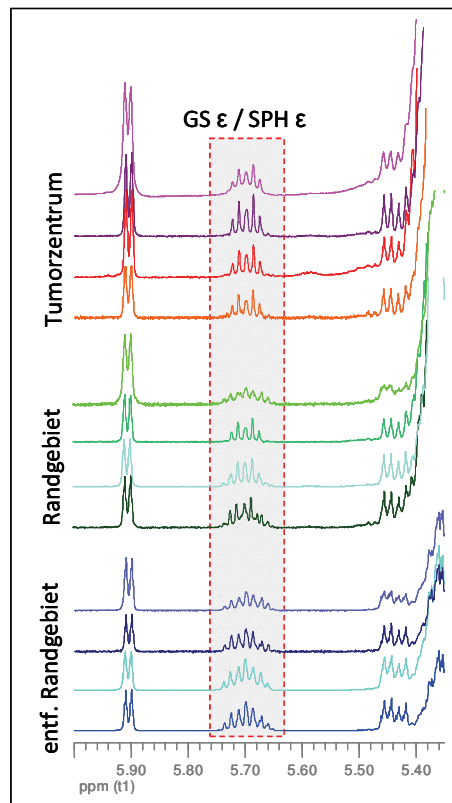


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrenausschnitte von vier Hirntumoren aus unterschiedlichen Bereichen: entferntes Randgebiet (blau), Randgebiet (grün) und Tumorzentrum (rot).

Galactosylceramide und Sulfatide werden im ZNS hauptsächlich von den Oligodendrozyten gebildet, welche die isolierende Myelinschicht der Neurone bilden. In geringeren Mengen treten sie auch in Astrozyten und Neuronen auf^[205]. Der erhöhte GS-Gehalt in den entfernten Randgebieten könnte durch Myelin-Anteile in diesen Proben hervorgerufen werden. Die entfernten Randgebiete wurden an der Grenze zwischen infiltrierter Zone und gesundem Gewebe entnommen, so dass diese auch myelinhaltige Strukturen enthalten können. Eine weitere Erklärung könnte in einem veränderten Stoffwechsel der (Glyco-)Sphingolipide liegen. Die Lipide dieser Klasse übernehmen vielfältige Funktionen (siehe Abbildung 21), sie dienen u. a. als Second Messenger und regulieren Proliferation, Überleben und Zelltod^[206]. Galactosylceramide werden durch die Übertragung einer Galactose auf das Ceramidgrundgerüst gebildet. Es ist bekannt, dass in Gliomen Ceramide, die u. a. an Zelltodsignalwegen beteiligt sind, erniedrigt sind^[207].

Zudem sind chemoresistente Gliomzellen in der Lage, durch äußere Stimuli freigesetzte Ceramide über die Bildung von Glucosylceramiden schnell zu verstoffwechseln und so die Apoptose zu umgehen^[208]. Die Hemmung der Glucosyltransferase in den resistenten Zellen führte zu einer Aufhebung der Resistenz. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Gliomen Glucosylceramide gegenüber den Galactosylceramiden bevorzugt gebildet werden.

Die verminderten Ceramidgehalte und die bevorzugte Metabolisierung zu Glucosylceramiden stellen eine mögliche Erklärung für die niedrigen GS-Gehalte in den Tumorzentren dar. Glucosylceramide sind zudem die biosynthetischen Vorstufen zu den komplexeren Glycosphingolipiden/ Gangliosiden. Diese sind u. a. an Prozessen der Zellerkennung und Kommunikation beteiligt und werden in Gliomen vermehrt gebildet^[209].

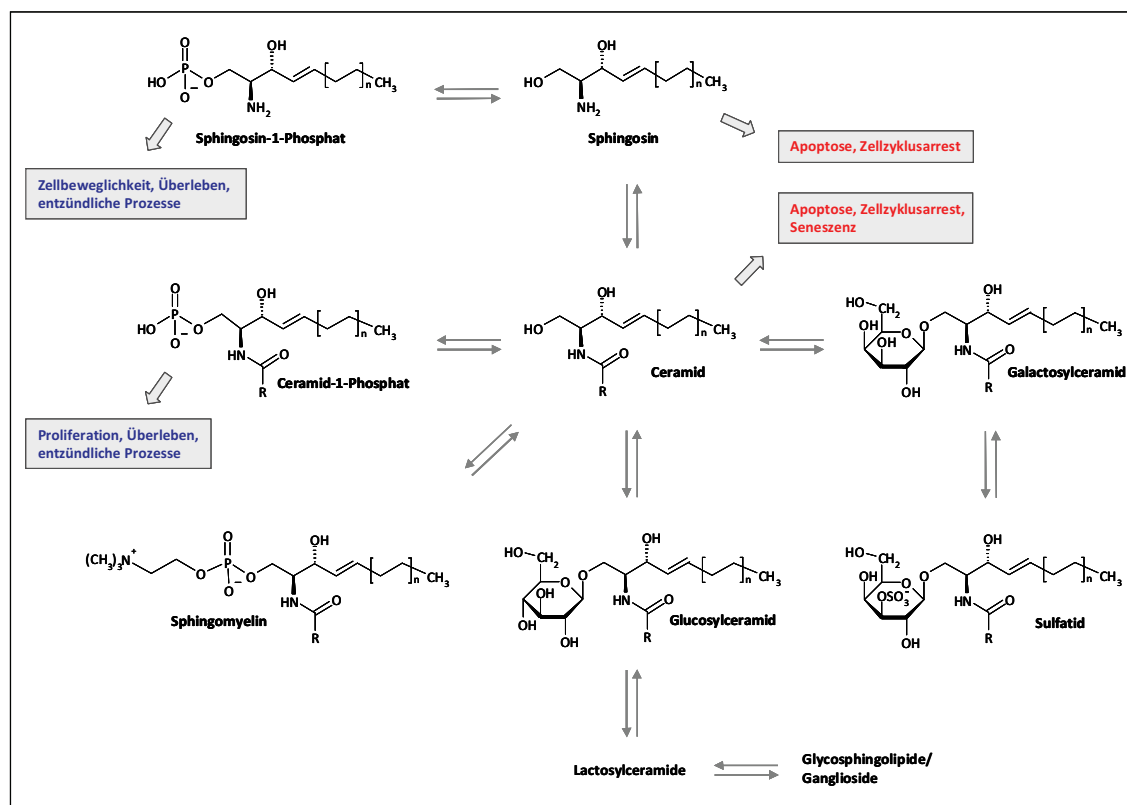


Abbildung 21: Funktion und Stoffwechsel der Sphingolipide (modifiziert nach [206]).

Neben den 1D ^1H -NMR-Spektren wurden von insgesamt 34 Lipidextrakten 2D ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren aufgenommen. Die Auftragung der Signale in 2 Dimensionen ermöglicht eine Entzerrung der überlagerten Resonanzen. In einigen dieser Spektren wurde ein Signal einer unbekannten Komponente beobachtet, welches im olefinischen Bereich bei 5.122/125.36 ppm hochfeldverschoben zu den Signalen der MUFA/PUFA lag (siehe Abbildung 22b). In den ^1H -NMR-Spektren wurde es von den Methinprotonen des Glycerolgerüsts der Plasmalogene (PE(plas) β) und der Diacylglyceride (DAG β) leicht überlagert (siehe Abbildung 22a).

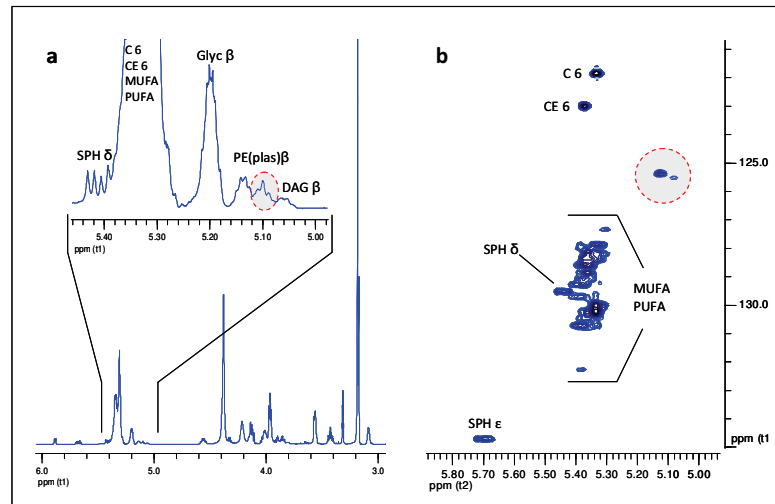


Abbildung 22: Lage des unbekannten Signals (farblich hervorgehoben) eines lipophilen Tumorextrakts a) im ^1H -NMR-Spektrum und b) im ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum (kalibriert auf MeOD 3.34ppm/49.2ppm).

Dieses Signal wurde in 31 von 34 Spektren der Tumorzentren detektiert und in 11 von 19 Spektren der Tumorrandgebiete. In den 4 Spektren der entfernten Tumorrandgebiete wurde es dagegen nicht beobachtet. Eine Einwaage bedingte bzw. größenabhängige Korrelation konnte ausgeschlossen werden, da das Signal auch in Zentrumsproben identifiziert wurde, deren Einwaage der Masse der entfernten Randgebiete entsprach oder darunter lag. Es scheint demnach ein Charakteristikum der Tumorzellen zu sein. In den Proben des Tumorrandgebiets befinden sich sowohl gesunde als auch entartete Zellen, so dass dieses Signal bei großem Anteil an Tumorzellen zu detektieren ist. Die Strukturaufklärung des unbekannten Lipids wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

2.2.2 Strukturaufklärung des unbekannten Lipids

Für die Strukturaufklärung wurde zunächst ein konzentrierter Lipidextrakt eines Tumorzentrums (anaplastisches Astrozytom Grad III) ausgewählt und mit verschiedenen 2D homo- und heteronuklearen NMR-Experimenten analysiert. Neben H,H -TOCSY- bzw. H,H -COSY-Experimenten erfolgte die Analyse der Lipide über ^1H , ^{13}C korrelierte HSQC-, HSQC-TOCSY- und HMBC-Experimente. Dabei wurde für das HSQC eine Edierungspulssequenz verwendet, so dass die Kohlenstoffmultiplizitäten bestimmt werden konnten. Methyl- und Methingruppen weisen eine positive Phase auf und Methylengruppen eine negative Phase. Diese zusätzliche Information ist wichtig, da die Protonenzahl in den komplexen ^1H -NMR-Spektren der Extrakte aufgrund der Überlagerungen nicht bestimmt werden kann.

Aus den Informationen der verschiedenen NMR-Experimente wurde zunächst eine Substruktur der unbekannten Komponente ermittelt. Demnach besteht diese aus einer olefinischen Einheit, die aufgrund ihrer Verschiebung kein Teil eines konjugierten

olefinischen, aromatischen oder heteroaromatischen Systems sein kann. Es wurden drei Kopplungen zu zwei Methylen- (2.05/26.78 ppm bzw. 2.04/32.56 ppm) und einer Methylgruppe (1.68/23.65 ppm) im Hochfeldbereich beobachtet, die ebenfalls untereinander koppelten. Zudem ging aus dem HMBC-Spektrum hervor, dass in der Doppelbindung neben dem Proton tragenden tertiären Kohlenstoffatom ein quartärer Kohlenstoff (135.5 ppm) vorliegt. Die beobachteten Kopplungen ließen auf eine isoprenoide Substruktur schließen (siehe Abbildung 23). Ausgehend von dieser Substruktur konnten jedoch keine weiteren skalaren Kopplungen detektiert werden. Dies spricht für eine mehrfache Wiederholung dieser Substruktur.

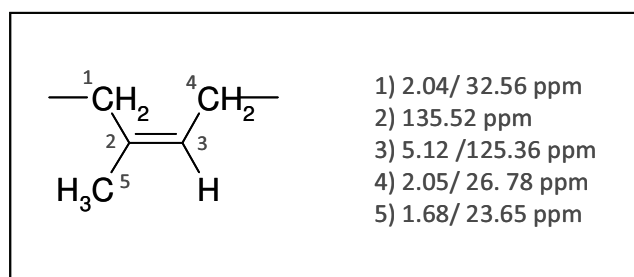


Abbildung 23: Darstellung der aus den 2D NMR-Experimenten abgeleiteten Substruktur.

Die Analyse ist zum einen durch eine große Signaldichte im Hochfeldbereich erschwert, zum anderen ist die unbekannte Komponente in den Extrakten im Vergleich zu anderen Lipiden geringer konzentriert.

Deshalb wurden acht Lipidextrakte (Tumorzentren) über eine Festphasenextraktion (vgl. Kapitel 2.4) in die verschiedenen Lipidklassen aufgetrennt, um

1. die Signale der anderen Lipide in den Spektren zu reduzieren,
2. Informationen über den chemischen Charakter zu erhalten und
3. die unbekannte Komponente aufzukonzentrieren.

Die Auftrennung erfolgte nach der Polarität, so dass im ersten Schritt neutrale Lipide, freie Fettsäuren und Phospholipide getrennt wurden. Anschließend wurden in einem zweiten Schritt CE, TAG, C, DAG und Monoacylglyceride (MAG) separiert.

In allen Auftrennungen eluierte die unbekannte Komponente mit den neutralen Lipiden. CE und TAG konnten bei der verwendeten Methode nicht getrennt werden. Diese eluierten zusammen in der ersten Fraktion, so dass in der eigentlichen TAG-Fraktion nur noch restliche Mengen an TAG identifiziert wurden. Die ersten zwei Fraktionen enthielten auch die unbekannte Komponente (siehe Abbildung 24). Zudem wurde diese in fünf Auftrennungen auch in die nachfolgende C-Fraktion verschleppt. Demnach ist die unbekannte Komponente unpolar und gehört nach den spektroskopischen Ergebnissen zu keiner der aufgetrennten Klassen. Somit überrascht eine Verteilung auf mehrere Fraktionen nicht, da die SPE speziell auf die Trennung der obigen Lipidklassen ausgerichtet ist.

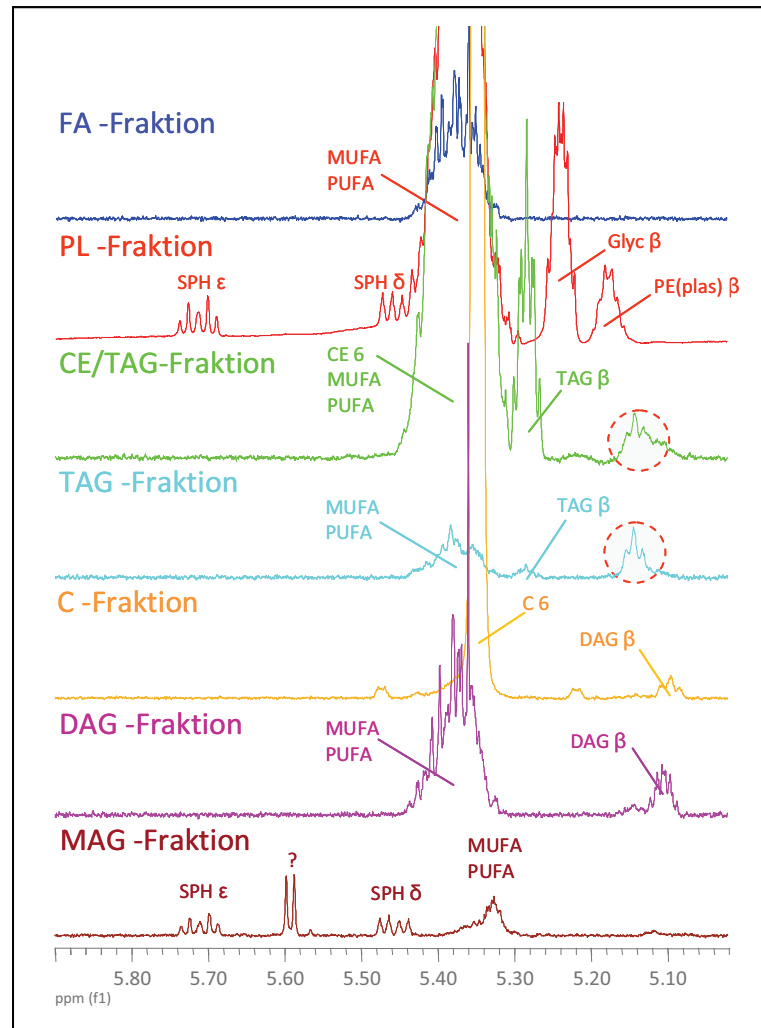


Abbildung 24: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aufgetrennten Fraktionen. Die unbekannte Komponente eluiert vornehmlich mit den unpolaren Cholesteroestern und Triacylglyceriden.

Die CE- und TAG-Fractionen wurden anschließend für die Aufkonzentrierung zusammengegeben und erneut wurden die Kopplungsmuster mit verschiedenen 2D homo- und heteronuklearen NMR-Experimenten analysiert. Trotz der Signalverminderung durch die Trennung der Lipidklassen konnten keine weiteren Kopplungen identifiziert werden. Somit wurden zusätzlich verschiedene Lipidstandards NMR-spektroskopisch analysiert. Aufgrund der ermittelten isoprenoiden Substruktur wurden u. a. verschiedene Isoprenderivate untersucht. Beispielsweise wurden Farnesol (Sesquiterpen) und Squalen (Triterpen) als biosynthetisch relevante Vorstufen (Ersteres in Form des Diphosphats) der Steroide ausgewählt, ebenso Dolicholphosphat als Vertreter der Polyisoprenderivate (siehe Abbildung 25).

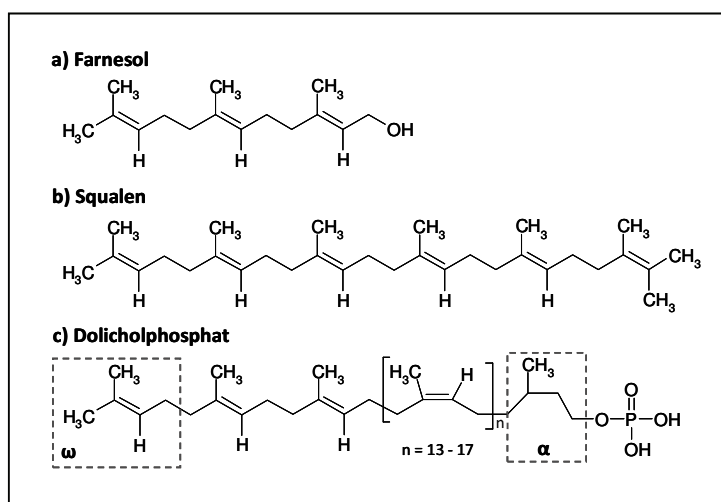


Abbildung 25: Strukturformeln der analysierten Lipidstandards. Farnesol (a) und Squalen (b) weisen eine all-trans Konfiguration der Doppelbindung auf, während Dolicholphosphat (c) durch eine di-trans-poly-cis Konfiguration gekennzeichnet ist. Die endständigen Isopreneinheiten werden mit α bzw. ω bezeichnet, wobei Erstere gesättigt vorliegt.

Dabei zeigte sich, dass die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der unbekannten Komponente mit denen des Dolicholphosphats übereinstimmten. Dies wurde in einem *Spiking*-Experiment überprüft (s. Abbildung 26). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale der unbekannten Komponente nach der Zugabe von Dolicholphosphat ansteigen. Demnach liegt dieser eine sich wiederholende Isopreneinheit zu Grunde, so dass die Verbindung den Polyisoprenen zugeordnet werden kann. Dies erklärt auch die fehlenden Kopplungen zu weiteren funktionellen Gruppen. Wenn das Molekül aus vielen aufeinander folgenden Isopreneinheiten besteht, weisen die Methylene- und Methylgruppen und auch die olefinischen Protonen innerhalb der Kette jeweils die gleiche chemische Verschiebung (Isochronie) auf. Deshalb sind in den Extrakten nur die Signale der mittigen Isopreneinheiten aufgrund der großen Protonenzahl detektierbar, während die Signale der endständigen Isopreneinheiten unter der Detektionsgrenze liegen, da sie nur von 1 bis 3 Protonen hervorgerufen werden.

In Zellen treten Polyisoprene hauptsächlich in Form des freien Dolichols und in geringeren Mengen als Dolicholphosphat auf. Daneben wurden Fettsäureester^[210] und freie Dolicholsäure^[211] nachgewiesen. Zudem sind Pyrophosphate und verschiedene glykolisierte Formen als Intermediärprodukte der Glycoproteinbiosynthese bekannt^[212]. Die Methylengruppe, die mit der funktionellen Gruppe der α -Isopreneinheit substituiert ist, weist eine charakteristische Verschiebung auf. Im Dolicholphosphat beträgt diese 4.210 ppm, im Dolichol dagegen 3.602 ppm (anhand von Lipidstandards ermittelt). Im ^1H -NMR-Spektrum der aufkonzentrierten Probe sind beide Multipletts in geringer Intensität vorhanden (Abbildung 27). Der Bereich um 3.6 ppm ist jedoch durch weitere Signale zum Teil überlagert, welche vor der SPE nicht vorhanden waren. Über eine Blindwertbestimmung konnte bestätigt werden, dass es sich um aus dem Sorbens/der Kartusche herausgelöste Rückstände handelt. Demnach sind nach der NMR-spektroskopischen Analyse sowohl Dolichol als auch Dolicholphosphat enthalten.

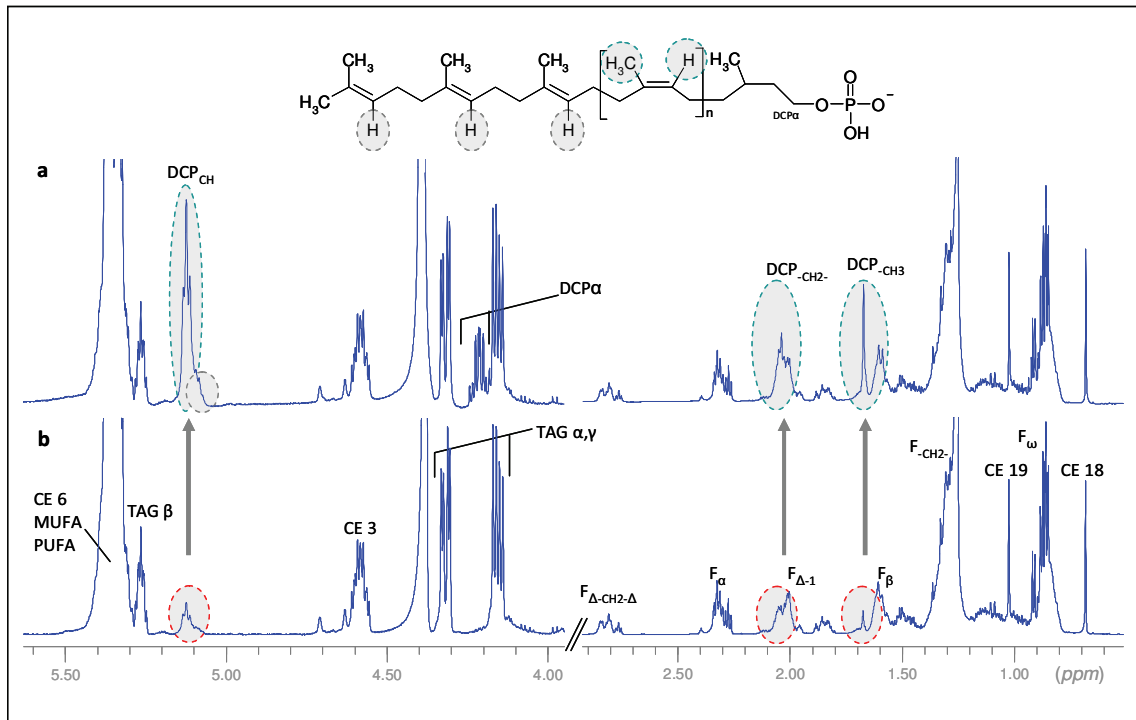


Abbildung 26: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aufkonzentrierten Probe (mit geringerer Intensität im Hochfeldbereich) vor der Zugabe von Dolicholphosphat (b) und nach der Zugabe von Dolicholphosphat (a). Die Signale der unbekannten Komponente bei 5.1 ppm, 2.05 ppm und 1.7 ppm sind farblich hervorgehoben.

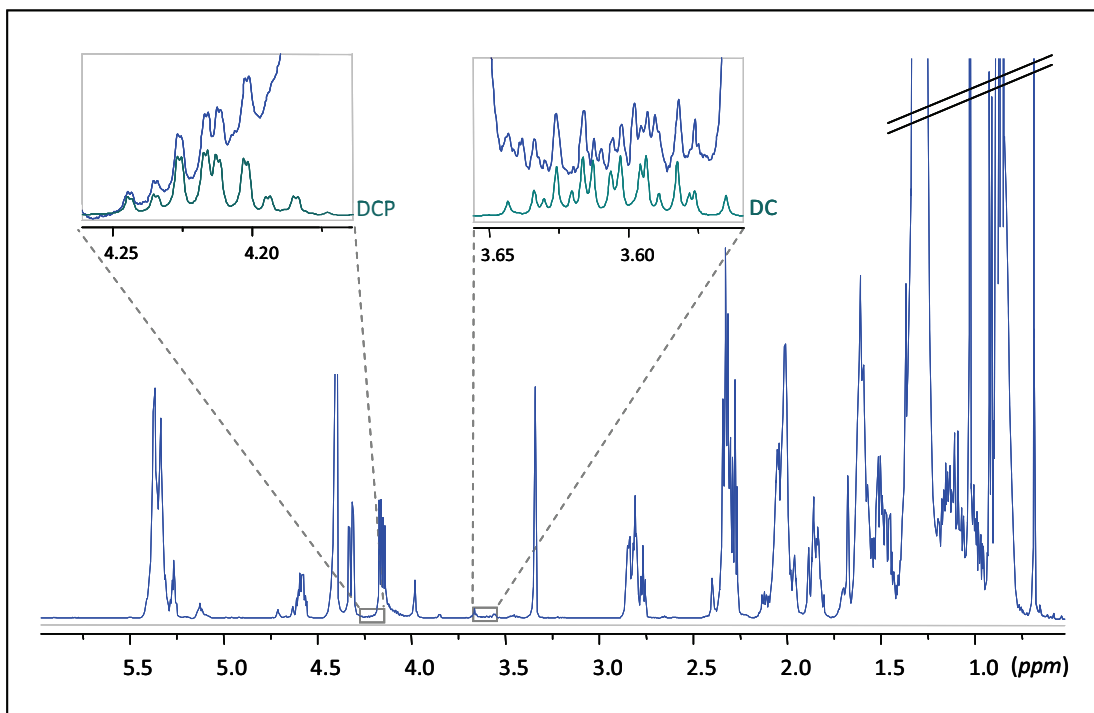


Abbildung 27: ^1H -NMR-Spektrum der aufkonzentrierten Probe mit vergrößerten Signalbereichen. Die Dolicholphosphat- (DCP) bzw. Dolichol- (DC) Multipletts sind untergelagert zum Vergleich gezeigt.

Um nähere Informationen über die Kettenlänge zu erhalten und die NMR-spektroskopischen Ergebnisse zu bestätigen, wurden zudem mehrere Proben massenspektrometrisch untersucht. Neben der aufkonzentrierten Probe wurden auch Fraktionen aus der Auftrennung analysiert, die Dolichol enthielten, aber nicht für die Aufkonzentrierung verwendet wurden. Dolichole können mittels der Elektrospray-Ionisierung (ESI-MS) analysiert werden. Neben der Analyse im negativen Ionenmodus als $[M-H]^-$ Molekülonen ermöglicht ein Zusatz von Lithiumsalzen die Kationisierung im positiven Modus ($[M+Li]^+$)^[213].

Mittels Spritzenpumpenmessungen wurden in der aufkonzentrierten Probe im negativen Ionenmodus Dolichole mit 90 und 95 Kohlenstoffatomen (Dolichol-90 bzw. -95) als $[M-H]^-$ Molekülonen detektiert. Diese bildeten im positiven Ionenmodus $[M+Na]^+$ - und nach der Zugabe von Lithiumacetat $[M+Li]^+$ - Pseudomolekülonen. Der Basispeak im negativen Ionenmodus wurde durch eine nicht zugeordnete Substanz hervorgerufen, im positiven Ionenmodus dominierten die TAG, welche ebenfalls in der Fraktion vorhanden waren. Somit wiesen die Dolicholsignale nur eine geringe Intensität auf. Dolichole liegen im menschlichen Gewebe in Gemischen unterschiedlicher Kettenlänge vor, wobei Dolichol-95 dominiert^[214]. Demnach wurden in der aufkonzentrierten Probe nur die am häufigsten auftretenden Spezies identifiziert. Dies liegt vermutlich an der Zusammensetzung der aufkonzentrierten Probe, in der die Dolichole im Vergleich zu den anderen Lipiden (TAG und CE) nur einen geringen Gehalt aufwiesen. In den anderen untersuchten Fraktionen wurden Dolichole mit Kettenlängen von 90 bis 105 Kohlenstoffatomen detektiert (siehe Abbildung 28).

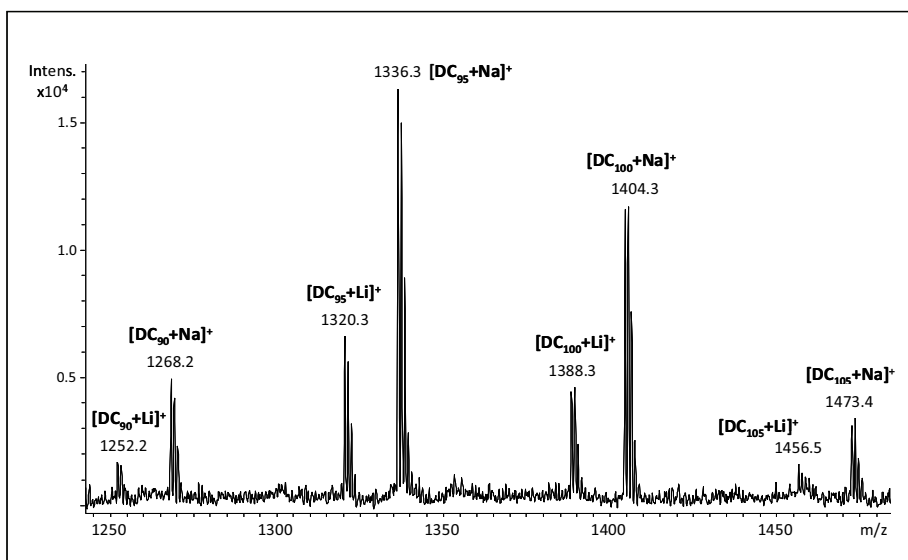


Abbildung 28: Ausschnitt eines ESI-MS-Spektrums im positiven Ionenmodus (gemessen aus Methanol nach Zugabe von Lithiumacetat).

Eine Fragmentierung der Molekülonen im positiven oder negativen Ionenmodus war nicht möglich. Spätere Messungen eines Dolicholstandards zeigten, dass dieser nur im positiven Modus unter sehr hoher Energiezufuhr fragmentierte. Lediglich das Lithium-Addukt zeigte in geringer Intensität die charakteristischen Neutralteilverluste der Isopreneinheiten (68 u). Die Fragmentierung eines Analyten ist wesentlicher Bestandteil für die Absicherung der Zuordnung, so dass die in den Proben detektierten Massenzahlen lediglich Hinweise auf die Moleküle geben. Die Isotopenmuster stimmten jedoch mit simulierten Mustern überein, so dass die richtige Zuordnung hoch wahrscheinlich ist.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die massenspektrometrische Analyse erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde, so dass eine Hydrolyse der Phosphatderivate nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem bestätigten weitere NMR-spektroskopische Analysen der aufkonzentrierten Probe die Hydrolyse eines Teils der TAG und der CE zu DAG und C. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Proben sowohl Dolichol als auch Dolicholphosphat enthielten, obwohl Letzteres nicht in den Massenspektren detektiert wurde.

In humanen Zellen liegen ca. 8 bis 10% der Dolichole phosphoryliert vor. Dolichole und ihre Derivate sind in den Zellwänden lokalisiert, vor allem in der Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum, den Golgivesikeln und den Lysosomen. Besonders endokrine Gewebe weisen größere Mengen an Dolicholen auf. So liegt der Dolicholgehalt in der menschlichen Hypophyse bei 7170 µg/g Nassgewicht, im Gehirn dagegen durchschnittlich bei 279 µg/g Nassgewicht^[210]. Demnach sind Dolichole im gesunden Gehirngewebe geringer konzentriert. Der erhöhte Gehalt in der Hypophyse wurde auch im Lipidextrakt eines untersuchten Hypophysenadenoms beobachtet, welches einen deutlich intensiveren olefinischen Dolicholsignal im Vergleich zu den anderen Tumoren zeigte (vgl. Abschnitt 2.2.3). Daneben ist bekannt, dass der Dolicholgehalt im menschlichen Gehirn mit dem Alter zunimmt^[215]. Eine absolute Quantifizierung der Dolichole ist in den ¹H-NMR-Spektren schwierig, da die Signale überlagert werden. Dennoch scheint ein altersabhängiger Anstieg nicht der Grund für das Vorkommen dieser Spezies in den Tumorzentren zu sein. Zum einen wurden auch in Tumorzentren junger Patienten (< 30 Jahre) Dolichole identifiziert, zum anderen lag das durchschnittliche Alter der Patienten bei 51 Jahren, bei denen auch eine Probe vom entfernten Randgebiet genommen wurde. Diese Biopsate aus dem entfernten Randgebiet enthielten kein Dolichol.

Die Biosynthese des Dolichols verläuft wie bei den Steroiden über den Mevalonatweg. Nach der Bildung des Farnesylpyrophosphats erfolgt jedoch die Kettenverlängerung durch eine cis-Verknüpfung mit weiteren Isopreneinheiten (3-Isopentenylpyrophosphat), so dass Polyisoprene von 18 bis 21 Isopreneinheiten entstehen. Anschließend werden die Phosphatreste abgespalten und die Doppelbindung der α-Isopreneinheit gesättigt. Dolicholphosphat entsteht schließlich durch die Phosphorylierung der Hydroxygruppe^[210]. In Tumorzellen ist die Feedbackhemmung der Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase außer Kraft gesetzt^[216], so dass ihre Aktivität trotz steigender Cholesterolkonzentration nicht abnimmt.

Dies könnte ein Grund für die vermehrte Bildung der Dolichole sein, da ihre Biosynthese auch auf dem Mevalonatweg beginnt. Ein weiterer Grund könnte in der biologischen Funktion der Dolichole liegen. Zum einen modulieren Dolichole die Membranfluidität und –permeabilität und sind an der Vesikelfusion involviert. Zum anderen ist Dolicholphosphat an der Protein-N-Glykosylierung sowie der C- und O-Mannosylierung¹⁴ im Endoplasmatischen Retikulum beteiligt. Dabei dient es als Glycosylträger. Des Weiteren sind Dolicholphosphate an der Biosynthese von Glycosylphosphatidylinositol-Ankern der Proteine beteiligt^[214]. In Gliomen ist die Struktur der N-Glykane (Oligosaccharide) von Glycoproteinen der Zelloberfläche verändert. Sie weisen vorwiegend hochverzweigte N-gebundene Oligosaccharide auf^[217]. Dies könnte in Zusammenhang mit den erhöhten Gehalten von Dolichol und Dolicholphosphat in den Tumoren stehen, da Dolicholphosphat an der Biosynthese der N-gebundenen Oligosaccharide beteiligt ist. Untersuchungen ergaben, dass bestimmte an der Glykosylierung beteiligte Galactosyltransferasen in Gliomen überexprimiert sind^[218]. Inwiefern weitere beteiligte Enzyme, wie beispielsweise die cis-Prenyltransferase oder die Dolicholphosphat-Mannose-Synthase, vermehrt gebildet werden, ist nicht bekannt. Bisher wurden in der Literatur noch keine erhöhten Dolichol- bzw. Dolicholphosphatgehalte in Hirntumoren beschrieben. Verminderte Dolicholgehalte wurden dagegen bei Morbus Alzheimer, einer neurodegenerativen Erkrankung, beobachtet^[219].

2.2.3 Charakteristika der verschiedenen Tumorentitäten

Die untersuchten malignen astrozytären Tumoren gehörten verschiedenen Tumorentitäten an, deren Metabolitenprofile im Folgenden untereinander und mit dem Hypophysenadenom und Kraniopharyngeom verglichen werden. Dafür wurden – bei entsprechender Anzahl ($n > 1$) – die ¹H-NMR-Spektren der Extrakte gemittelt. Bei den Tumorentitäten mit $n=1$ ist zu beachten, dass diese nicht unbedingt die Grundgesamtheit repräsentieren, da die metabolische Zusammensetzung durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, u. a. durch die Anamnese des Patienten, die Ernährung und die Lebensumstände. Dies betrifft das Riesenzellglioblastom, das Oligodendrogliom und die oben genannten Tumoren, d. h. dieser Vergleich ist eine Fallstudie und erfolgt auf qualitativer Ebene, da lediglich von den anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen eine größere Probenzahl zur Verfügung stand. Die untersuchten Tumorarten und ihre Anzahl sind in Tabelle 6 aufgeführt.

¹⁴ N, C und O stehen dabei für die verschiedenen Anknüpfungspunkte der Oligosaccharide an die Enzyme. N: Bindung an ein Stickstoffatom der Seitenkette von Asparagin oder Arginin, C: Bindung an ein Kohlenstoffatom der Tryptophanseitenkette, O: Bindung an die Hydroxygruppe von Serin oder Threonin.

Tabelle 6: Anzahl der untersuchten Tumorentitäten.

Tumorentität	Probenzahl
Glioblastoma multiforme (IV)	15
Riesenzellglioblastom (IV)	1
Anaplastisches Astrozytom (III)	7
Anaplastisches Oligoastrozytom (III)	2
Anaplastisches Oligodendrogliom (III)	1
Astrozytom ohne Anaplasie	2
Hypophysenadenom	1
Kraniopharyngeom (I)	1

Neben den Tumoren wurden zudem die Spektren des entfernten Randgebiets ($n=4$) gemittelt, um auch einen Vergleich zu Gewebe mit nur sehr geringem neoplastischen Anteil zu ermöglichen.

2.2.3.1 Hydrophile Extrakte

Der Vergleich der Extrakte von Tumoren zum entfernten Randgebiet zeigte, dass die Tumoren (mit ein paar Ausnahmen) höhere Gehalte an BCAAs, Alanin, Taurin und Glycin aufwiesen. Acetat, N-acetylierte Verbindungen (größtenteils NAA), Glutamin, Glutamat, Succinat, Creatin und beide Inositolisomere (scyllo und myo) waren dagegen vermindert. Der Gesamtcholingehalt (tCho) war in den Astrozytomen, Oligoastrozytomen und im Oligodendrogliom größer als im entfernten Randgebiet. Zudem waren die Phosphocholine gegenüber den Glycerophosphocholinen in den hoch malignen Glioblastomen und im Riesenzellglioblastom erhöht, während in den anderen Extrakten die Phosphodiester dominierten.

In Abbildung 29 sind die ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen hydrophilen Extrakte gezeigt. Die markantesten Unterschiede innerhalb der Tumoren bzw. im Fall des entfernten Randgebiets zu den Tumoren sind hervorgehoben und werden im Folgenden kurz beschrieben. Dabei wird das Lactatsignal aufgrund seiner problematischen Aussage in entnommenem Gewebe außer Acht gelassen.

- Entferntes Randgebiet:

Die ^1H -NMR-Spektren der hydrophilen Extrakte des entfernten Randgebiets wiesen im Vergleich zu den Tumorzentren kleinere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse auf, da nur relativ geringe Gewebemengen entnommen werden konnten. So wurden größtenteils nur die Hauptkomponenten identifiziert. Die Spektren zeigten intensive Signale für NAA, freies Acetat (nur in zwei Spektren), Succinat und scyllo-Inositol. Auch myo-Inositol und Creatin waren hoch, während Glycin und Alanin nur geringe Gehalte aufwiesen. Glutamat und Glutamin lagen in einem Verhältnis von etwa 1 zu 1,8 vor. Hypotaurin wurde nicht beobachtet. Ebenso konnten in drei der vier Extrakte keine aromatischen Komponenten (nicht mit abgebildet) detektiert werden.

Diese lagen hier wahrscheinlich aufgrund der geringen Probenmenge unter der Nachweisgrenze. Auch GABA konnte deshalb nur in einem Extrakt nachgewiesen werden.

- Glioblastoma multiforme (WHO IV):

Die Extrakte der Glioblastome wiesen von den Tumoren die höchsten Gehalte an Glycin, N-acetylierten Verbindungen und Glutamat auf, wobei Letzteres den Gehalt im entfernten Randgebiet überstieg. Auch für Glutamin wurde ein relativ hoher Wert bestimmt, so dass Glutamat und Glutamin im Verhältnis 1 zu 1,4 vorlagen. Die BCAAs, Alanin, Hypotaurin und Succinat waren ebenfalls erhöht, während für Taurin und sowohl scyllo- als auch myo-Inositol (niedrigster Gehalt unter den Tumoren) verminderte Signale detektiert wurden.

- Riesenzellglioblastom (WHO IV):

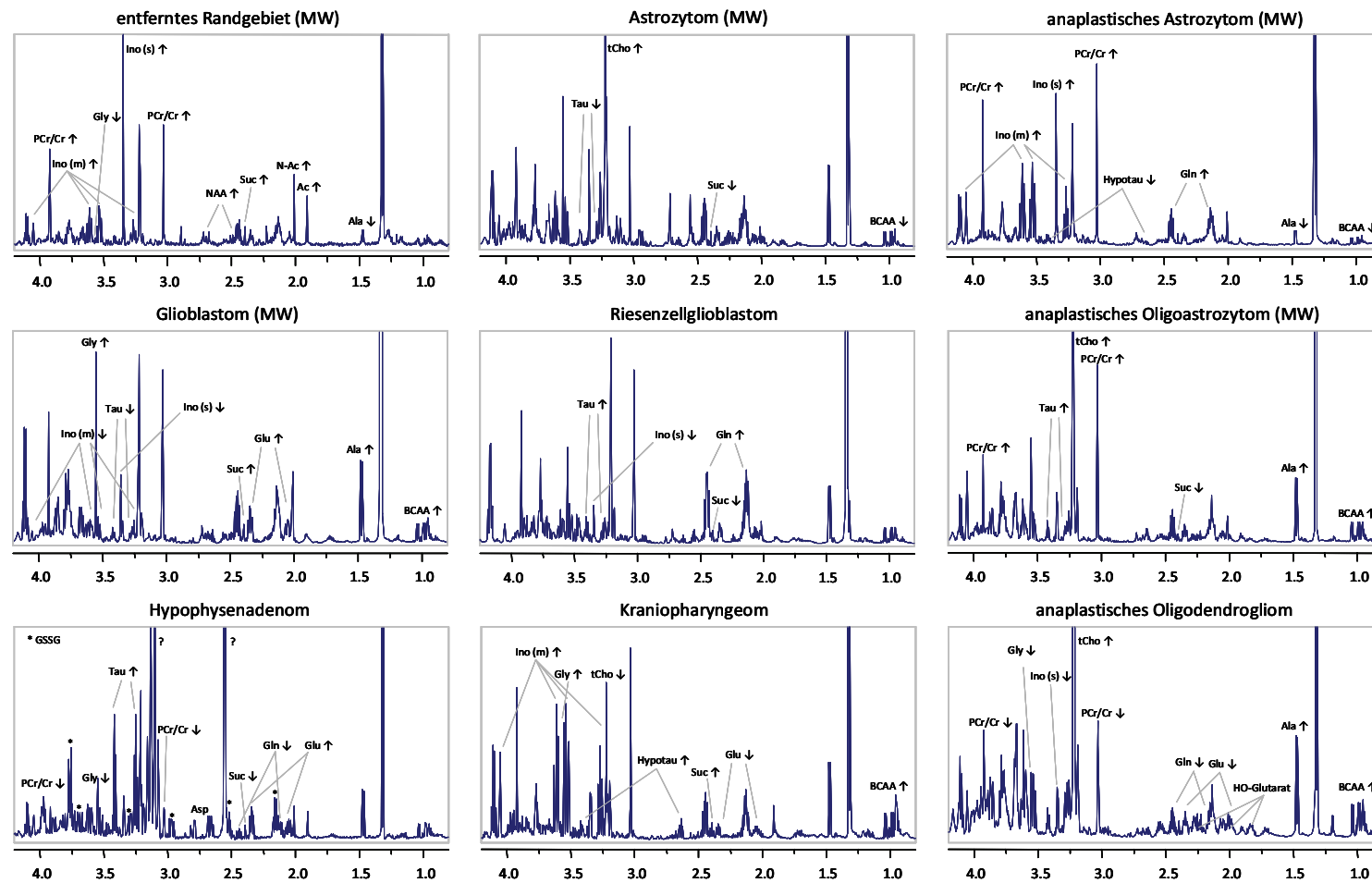
Das hydrophile Extrakt des Riesenzellglioblastoms unterschied sich leicht von dem gemittelten Spektrum der Glioblastome. Es wies von den Tumoren den höchsten Gehalt an Glutamin auf, so dass Glutamat zu Glutamin in einem Verhältnis von 1 zu 3,4 vorlagen. Zudem wurden erhöhte Taurinsignale und ein vermindertes Succinatsignal beobachtet. Die N-acetylierten Komponenten wiesen hier den geringsten Gehalt auf. Scyllo-Inositol (niedrigster Gehalt unter den Tumoren) war dagegen wie bei den Glioblastomen erniedrigt.

- Anaplastisches Astrozytom (WHO III):

Das gemittelte Spektrum der anaplastischen Astrozytome zeigte von den Tumoren die niedrigsten Gehalte an BCAAs und Alanin. Ebenso war der Gehalt an Hypotaurin erniedrigt. Dagegen wurden die höchsten Gehalte an scyllo-Inositol und Creatin/Phosphocreatin unter den Tumoren verzeichnet, ebenso wie hohe Signale von Glutamin (Glutamat/Glutamin-Verhältnis entsprach 1 zu 2,7) und myo-Inositol.

- Anaplastisches Oligodendrogliom (WHO III):

Der Extrakt des anaplastischen Oligodendroglioms zeigte den höchsten Gehalt an Gesamtcholin und hohe Werte an BCAAs und Alanin. Dagegen waren Glycin (niedrigster Wert unter den Tumoren), Creatin/Phosphocreatin, Glutamat und Glutamin (Verhältnis 1 zu 1) vermindert. Zudem wurde Hydroxy-Glutarat identifiziert, welches nur noch in geringerer Menge in den Extrakten der Astrozytome, der anaplastischen Astrozytome und Oligoastrozytome beobachtet werden konnte.



Signalzuordnungen: Ac (Acetat), Ala (Alanin), BCAA (branched chain amino acids), Cr (Creatin), tCho (Gesamtcholin), Gln (Glutamin), Glu (Glutamat), GSSG (oxidiertes Glutathion), Gly (Glycin), HO-Glutarat (Hydroxyglutarat), Hypotau (Hypotaurin), Ino (m) (myo-Inositol), Ino (s) (scyllo-Inositol), NAA (N-Acetylaspartat), N-Ac (N-Acetyl CH₃), PCr (Phosphocreatin), Suc (Succinat), Tau (Taurin).

Abbildung 29: ¹H-NMR-Spektren von 0.80 bis 4.20 ppm der verschiedenen Tumorentitäten und des entfernten Randgebiets (MW = Mittelwertspektren, kalibriert auf Cr 3.03 ppm). Charakteristische Veränderungen im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten bzw. beim entfernten Randgebiet im Vergleich zu Tumorgewebe sind jeweils eingezeichnet.

- Astrozytom:

Das gemittelte Spektrum der Astrozytome, welche nach der histopathologischen Begutachtung keine anaplastischen Zellen aufwiesen, enthielt neben verminderten Signalen der BCAAs und Succinat einen sehr hohen Gesamtcholingehalt. Taurin wies dagegen den niedrigsten Gehalt unter den Tumoren auf und auch Acetat konnte nicht detektiert werden. Glutamat und Glutamin lagen in einem Verhältnis von 1 zu 2,1 vor.

- Kraniopharyngeom:

Der Extrakt des Kraniopharyngeoms grenzte sich deutlich von den anderen Tumoren ab. Hier wurden die höchsten Signale an BCAAs, Acetat, Succinat, Hypotaurin und myo-Inositol verzeichnet. Glycin war ebenfalls erhöht, während Glutamat und Gesamtcholin (niedrigster Wert innerhalb der Tumoren) erniedrigt waren.

- Hypophysenadenom:

Das ^1H -NMR-Spektrum des Hypophysenadenoms unterschied sich von den anderen Tumoren durch einen sehr hohen Tauringehalt (höchster Wert aller Tumorentitäten). Zudem enthielt es die niedrigsten Signale von Succinat, Glutamin, Hypotaurin, und Creatin/Phosphocreatin. Acetat und Glutamat waren dagegen erhöht (Glutamat zu Glutamin 1 zu 0,2), während für Glycin ein verminderter Wert detektiert wurde. Des Weiteren waren Signale von Aspartat und Glutathion-Disulfid (GSSG) im Extrakt vorhanden. Ein Singulett und Signale eines AB-Systems konnten nicht zugeordnet werden. Diese wiesen sehr hohe Intensitäten auf, so dass sie evtl. von einer Verunreinigung stammen.

Im Tieffeldbereich der ^1H -NMR-Spektren waren die Unterschiede geringer. Die meisten Metabolite lagen in ähnlichen Verhältnissen vor, lediglich der Glucosegehalt war im Riesenzellglioblastom hoch. Hohe Glucosesignale wiesen ebenfalls das Kraniopharyngeom und das Hypophysenadenom auf. Ein weiterer Unterschied bestand in den ribosehaltigen Metaboliten. Diese wurden nur in geringen Mengen im Extrakt des Riesenzellglioblastoms beobachtet, während das Kraniopharyngeom und das Hypophysenadenom auch hier erhöhte Werte aufwiesen. Zudem wurden unterschiedliche Gehalte einiger nicht koppelnder aromatischer Gruppen beobachtet. Phenylalanin, Tyrosin und Histidin waren in allen Extrakten die vorherrschenden aromatischen Aminosäuren.

Der Vergleich der verschiedenen Tumortypen zeigt, dass sich besonders das Kraniopharyngeom und das Hypophysenadenom aufgrund ihrer unterschiedlichen Ursprungszellen (Epithelgewebe bzw. neuroendokrine Zellen) von den astrozytären Tumoren abgrenzen. Auch Letztere weisen – wenn auch in vermindertem Maße – Unterschiede auf. Beispielsweise ähnelt das Riesenzellglioblastom den Glioblastomen, weist aber weniger Glycin und mehr Taurin und Glutamin auf. Für eine statistische Absicherung sind jedoch weitere Proben besonders bei den Einzelfällen notwendig.

Biochemische Hintergründe:

Die metabolischen Unterschiede der Tumorzentren zum entfernten Randgebiet sind typische Charakteristika neoplastischer Veränderungen. Die geringeren Glutamin-, Glutamat- und Succinatgehalte sowie erhöhte Glycin- und Alaninwerte in den Tumoren reflektieren eine geringere Aktivität des Citratzyklus und eine erhöhte Glykolyserate^[59]. Auch Valin, Leucin und Isoleucin (BCAAs) weisen dadurch erhöhte Signale auf. Ebenso deutet der verminderte Creatinergehalt auf einen verschlechterten Energiestatus in den Tumoren hin.

Die Extrakte des entfernten Randgebiets gleichen den in der Literatur beschriebenen Profilen gesunden Gehirngewebes^{[72],[126]}. NAA und GABA sind neuronale Marker^[59], obwohl NAA auch in Vorläuferzellen für Oligodendrozyt-Typ 2-Astrozyten detektiert wurde^[117]. Durch das Wachstum der glialen Tumoren werden neuronale Strukturen verdrängt, so dass nur noch geringe oder keine Signale dieser Metabolite in Tumorextrakten detektiert werden. Die vorhandenen Signale von NAA und GABA in den Extrakten der Glioblastome, anaplastischen Astrozytome und Oligoastrozytome können auf das infiltrative Wachstum dieser Tumoren zurückgeführt werden^[59]. Die N-acetylierten Verbindungen im Extrakt des Hypophysenadenoms werden ebenfalls durch NAA hervorgerufen, welches auch in anderen Studien in Hypophysenadenomen identifiziert wurde^{[122],[126]}. Usenius et al. vermuteten, dass die Tumoren NAA aus Gewebeseinschlüssen der Neurohypophyse enthielten^[122].

Intensive Acetatsignale wurden nur in den Extrakten des Hypophysenadenoms, des Kraniopharyngeoms und in zwei Extrakten des entfernten Randgebiets detektiert. Auch in anderen Untersuchungen wurde Acetat sowohl in gesundem als auch neoplastischem Gewebe beobachtet^{[59],[115],[118]}. Die Bildung des freien Acetats könnte durch die Hydrolyse acetylierter Verbindungen bei der Aufarbeitung erfolgen. Ein Anstieg entsprechender Stoffwechselprodukte (z. B. Aspartat) wurde jedoch im entfernten Randgebiet und im Kraniopharyngeom nicht beobachtet. Lediglich das Hypophysenadenom wies eine entsprechende Menge freies Aspartat auf. Die erhöhten Acetatsignale könnten auch durch die unterbrochene Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr nach der Resektion hervorgerufen werden. Studien zeigten einen Anstieg des Acetatsignals nach ischämischen Perioden^{[45],[220]} aufgrund des beginnenden Abbaus von Fettsäuren^[220]. Für die Bildung des Acetats durch ischämische Prozesse spricht zum einen, dass der Acetatgehalt in Extrakten von der Oberfläche, dem Kern bis hin zum nekrotischen Zentrum eines Tumors anstieg^[59]. Zum anderen wiesen die zwei acetathaltigen Extrakte des entfernten Randgebiets auch einen höheren Alaningehalt als die beiden anderen auf, was ebenfalls charakteristisch für ischämische Prozesse bzw. für Anteile von Tumorzellen ist.

Myo-Inositol ist im entfernten Randgebiet und noch stärker in den anaplastischen Astrozytomen und im Kraniopharyngeom erhöht, während in den Glioblastomen stark verminderte Gehalte detektiert wurden. Auch Righi et al. beobachteten diesen Verlauf^[161]. In anderen Untersuchungen war dagegen der Gehalt von myo-Inositol in gesundem Gewebe teilweise höher^[59], teilweise niedriger^[126] als in den Tumoren.

Dies kann neben einem veränderten Tumorstoffwechsel auch an unterschiedlichen Anteilen an Gliazellen in den gesunden Gewebeproben liegen, da myo-Inositol ein glialer Marker ist und nicht von Neuronen gebildet wird^[221]. Die Abnahme des myo-Inositols innerhalb der astrozytären Reihe wurde auch in anderen Studien^{[63],[149],[222]} beobachtet, während Kinoshita et al. wiederum in Glioblastomen eine erhöhte Konzentration detektierten^[126]. In der gleichen Studie wurde zudem nur wenig myo-Inositol in Kraniopharyngeomen beobachtet. Somit sollte dieser Wert über die Analyse weiterer Kraniopharyngeome abgesichert werden. Die variablen Ergebnisse dieser Studie und die unterschiedlichen Angaben in der Literatur könnten in der biologischen Funktion des myo-Inositols begründet sein. Es ist an der Regulierung osmotischer Prozesse und an der Detoxifizierung der Zellen über die Bildung von Glucoroniden beteiligt^[223]. Zudem dient es als Speicher für die phosphorylierten Derivate IP_2 und IP_3 , die als Second Messenger in der Signalweiterleitung z. B. bei der Zellproliferation beteiligt sind^[123]. Damit steht der Inositolgehalt in Zusammenhang mit der Proliferationsrate und der Zellentgiftung, so dass sein Gehalt vom aktuellen Status der Zellen abhängig und damit recht variabel ist.

Scyllo-Inositol wies dagegen in allen Tumoren im Vergleich zum entfernten Randgebiet verminderte Signale auf, wobei unter den Tumoren in den anaplastischen Astrozytomen der höchste Gehalt detektiert wurde. In den Extrakten der Glioblastome und des Riesenzellglioblastoms war es dagegen wie myo-Inositol stark vermindert. Dies bestätigt die Ergebnisse von Maxwell et al., die ebenfalls eine Abnahme von scyllo-Inositol mit der Malignität verzeichneten^[63]. Die biologische Funktion von scyllo-Inositol ist noch nicht geklärt, aber es wird in Zusammenhang mit myo-Inositol gesetzt^[224]. Eine Korrelation beider Metabolite konnte in den Extrakten jedoch nicht beobachtet werden.

Das Verhältnis von Glutamat zu Glutamin innerhalb der Tumoren war sehr variabel. Die in der Literatur beschriebene Verschiebung in glialen Tumoren von Glutamat zu Glutamin im Vergleich zu gesundem Gewebe^{[59],[72]} konnte nur bei dem Riesenzellglioblastom, den anaplastischen und den einfachen Astrozytomen beobachtet werden. Im Oligodendrogliom und in den Mischgliomen war Glutamin dagegen stark vermindert, während in den Glioblastomen das Verhältnis zugunsten des Glutamats verschoben war. Somit wurde innerhalb der astrozytären Reihe ein Anstieg des Glutamats beobachtet, welcher auch in einer anderen Studie beschrieben ist^[65]. Für die Interpretation müssen mehrere Aspekte in Betracht gezogen werden. Auf der einen Seite ist bekannt, dass der Citratzyklus in Tumoren häufig gestört ist (u. a. Inaktivierung der Aconitase) und eine erhöhte aerobe Glykolyse und Glutaminolyse zur Energiegewinnung stattfindet. Auf der anderen Seite ist Glutamat einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter und sollte durch die Verdrängung des neuronalen Gewebes abnehmen. Studien haben jedoch gezeigt, dass Gliomzellen im Gegensatz zu ihren Ursprungszellen¹⁵ Glutamat nur in vermindertem Maße aufnehmen und es

¹⁵ Im ZNS besteht ein Glutamat-Glutamin-Zyklus zwischen Neuronen und Astrozyten. Nach der Ausschüttung des Glutamats und der Reizweiterleitung wird der extrazelluläre Neurotransmitter von den Astrozyten aufgenommen und zu Glutamin metabolisiert. Dieses wird den Neuronen zugeführt, welche daraus wiederum Glutamat synthetisieren.

sogar vermehrt über ein Cystin-Glutamat-Austauschprotein freisetzen^[225]. Dies ist durch einen vermehrten Bedarf an Glutathion¹⁶ bedingt und könnte ein Grund für den erhöhten Glutamatgehalt in den Glioblastomextrakten sein, da die Extrakte sowohl intra- als auch extrazelluläre Metabolite enthalten.

Taurin bzw. Hypotaurin wiesen - wie in anderen Studien auch - in den Tumoren höhere Konzentrationen als in den entfernten Randgebieten auf, in denen Hypotaurin nicht detektiert wurde. Dabei konnte jedoch kein Anstieg des Tauringehalts mit der Malignität beobachtet werden, wie es in der Literatur beschrieben ist^{[59],[126]}. Taurin wird in Zusammenhang mit der Malignität und Aggressivität von Tumoren gesetzt^[226] und ist an osmoregulatorischen Prozessen beteiligt^[84]. Letztere Funktion könnte in Zusammenhang mit einer in einer MAS-Studie beschriebenen Korrelation der Taurinkonzentration zu dem Anteil an apoptotischen Zellen stehen, da bei der Apoptose die Zellen zunächst schrumpfen. Die Autoren postulierten, dass Taurin ein möglicher Marker für Apoptose ist^[156]. Die charakteristisch hohen Taurinsignale im Hypophysenadenom sind durch das Ursprungsgewebe bedingt, da endokrine Gewebe wie die Hypophyse viel Taurin enthalten^[126].

Neben den erhöhten Taurinsignalen war das Extrakt des Hypophysenadenoms im Vergleich zu den anderen Tumoren durch hohe Werte an GSSG gekennzeichnet. Dies ist ein Hinweis auf vermehrten oxidativen Stress. Freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies, die beispielsweise bei der Zellatmung entstehen, werden durch die Reaktion mit Glutathion (GSH) abgefangen, welches dadurch zum Disulfid oxidiert wird.

Die hohen Glycin- und Alaningehalte in den Glioblastomen sind Charakteristika dieses Tumortyps^{[59],[72],[126],[148]}. Lehnhardt et al. beobachteten zudem, dass beide Metabolite bei der Malignisierung von Tumoren anstiegen^[72]. Die erhöhten Werte sind vor allem durch eine erhöhte Glykolyserate bedingt. Zudem ist die Serin-Hydroxy-Methyl-Transferase in Tumoren exprimiert, welche die Transformation von Serin zu Glycin katalysiert^[126]. Bei Gewebestudien sollte jedoch bedacht werden, dass Alanin auch bei ischämischen Prozessen, wie sie bei der Probenentnahme auftreten, ansteigt. Daher muss dieses mit Sorgfalt bewertet werden.

Hydroxyglutarat ist vor allem in dem Extrakt des Oligodendroglioms vertreten. Inwiefern dieses charakteristisch für diesen Tumortyp ist, muss über weitere Untersuchungen geklärt werden. In Gliomen wurde eine Mutation der Isocitratdehydrogenase 1 identifiziert, welche dazu führt, dass anstelle der eigentlich katalysierten Reaktion (Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat) α -Ketoglutarat zu Hydroxyglutarat reduziert wird. Damit sollte Hydroxyglutarat nicht unbedingt für Oligodendrogliome charakteristisch sein.

¹⁶ Cystin ist das Dimer der Aminosäure Cystein, welche neben Glycin und Glutamat für die Biosynthese des Glutathions benötigt wird.

Der Gesamtcholingehalt wird in Zusammenhang mit der Malignität und Progression von Tumoren gesetzt und ist *in vivo* sowie *in vitro* in Tumoren erhöht. Dabei steigt Phosphocholin unter Abnahme von Glycerophosphocholin mit der Malignität an^[131]. Dies konnte in den hoch malignen Tumoren (Glioblastome und Riesenzellglioblastom) nachvollzogen werden. Auch der hohe Gesamtcholingehalt im Oligodendrogliom wurde durch eine andere Studie bestätigt^[59]. Die erhöhten Werte der Phospholipidvorstufen werden durch einen aktiveren Stoffwechsel aufgrund der vermehrten Zellteilung und der damit einhergehenden notwendigen Membranbiosynthese hervorgerufen.

2.2.3.2 Lipophile Extrakte

Auch die Lipidextrakte unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Tumoren und zum entfernten Randgebiet (siehe Abbildung 30). Fettsäuren, Cholesterol, Plasmalogene (Plas), Phospholipide und Sphingomyeline waren in allen Extrakten vertreten. Galactosylceramide wurden dagegen vornehmlich in den entfernten Randgebieten, aber nicht oder nur in geringer Menge in den Tumoren detektiert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Bei CE, TAG und DAG sowie Dolichol und Lyso-Verbindungen verhielt es sich umgekehrt, diese traten nur in den Tumorextrakten auf. Das Verhältnis der α -Methylenprotonen zu den allylischen Methylenprotonen der PUFA ($Fa/\Delta CH_2\Delta$) war in dem entfernten Randgebiet am größten. Zudem lagen die verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren in unterschiedlichen Verhältnissen vor (siehe Abbildung 31). Im Folgenden werden die wichtigsten Unterschiede kurz beschrieben.

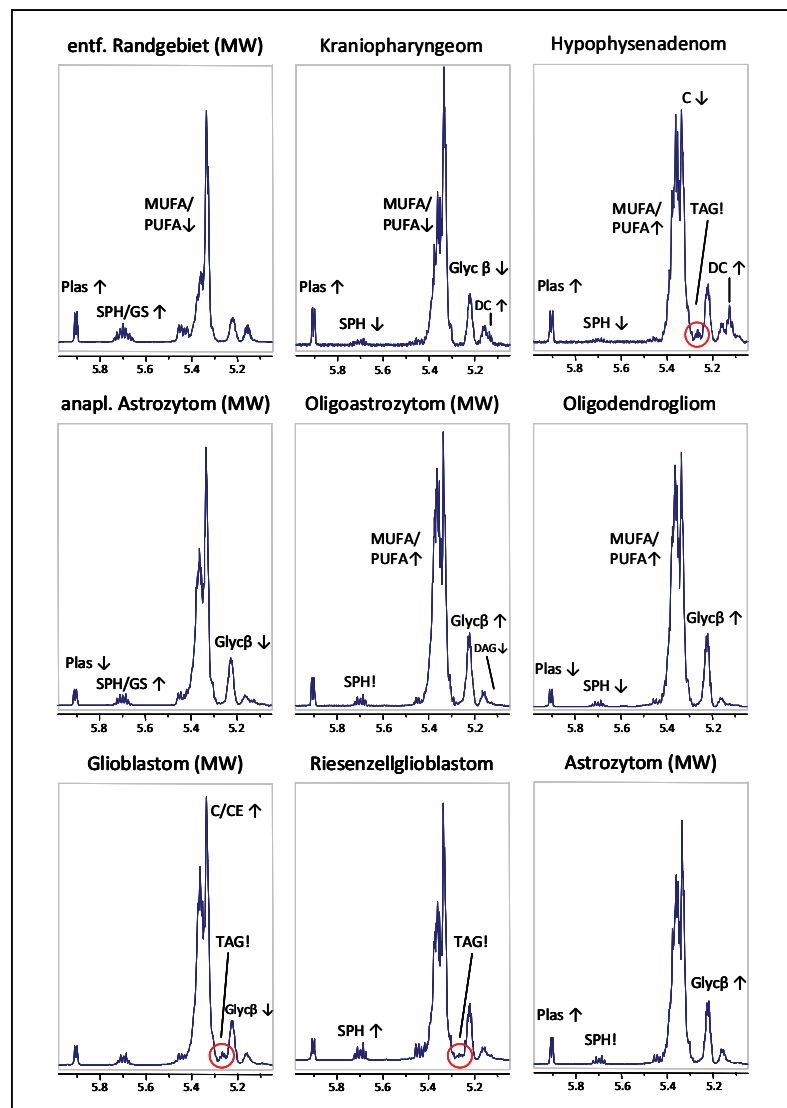


Abbildung 30: Olefinischer Bereich der 1H -NMR-Spektren der lipophilen Extrakte. Charakteristische Veränderungen innerhalb der Tumoren bzw. im Fall des entf. Randgebiets zu Tumorgewebe sind hervorgehoben.

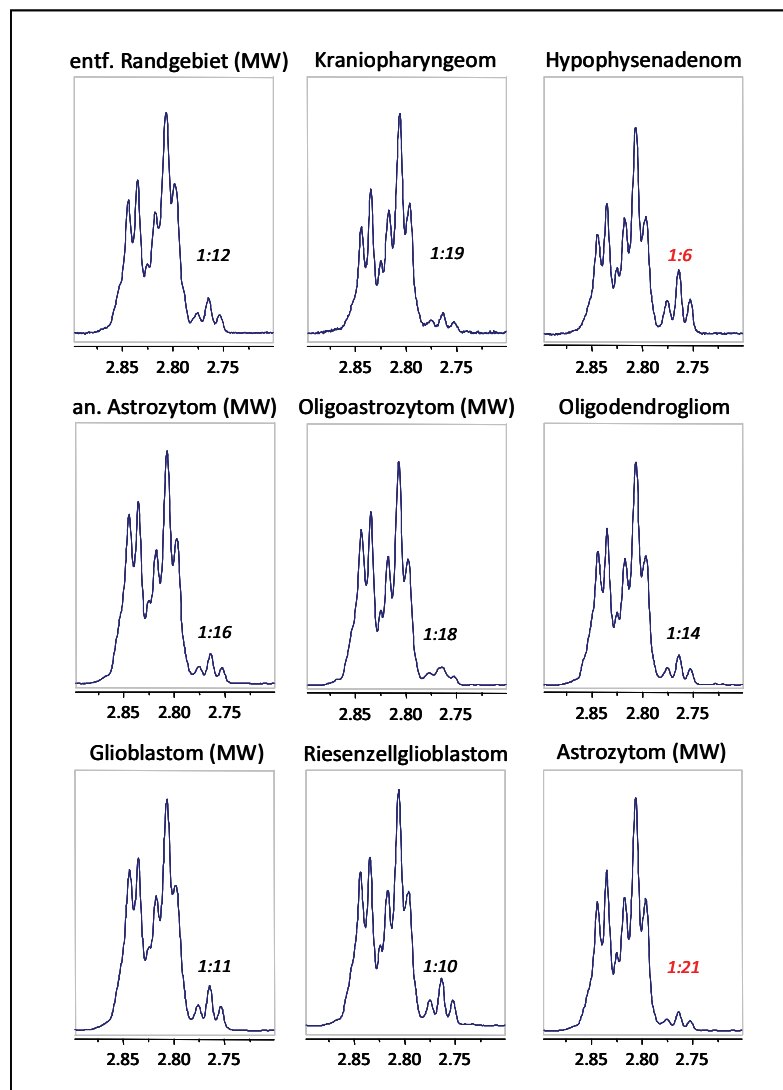


Abbildung 31: Der unterschiedliche Linolsäuregehalt im Vergleich zu den anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist an den allylischen Methylengruppensignalen deutlich zu erkennen. Angegeben ist jeweils das Verhältnis der Linolsäure zu den restlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

- Entferntes Randgebiet:

Die Lipidextrakte des entfernten Randgebiets enthielten mehr Cholesterol, Plasmalogene und Sphingolipide (vornehmlich mehr Galactosylceramide, siehe Abschnitt 2.2.1) als die Tumoren. Die Anteile der Fettsäuren, vor allem der MUFA und PUFA, der cholinhaltigen Lipide und der restlichen Phospholipide waren dagegen im Vergleich zu den Tumorlipidextrakten geringer. CE, TAG, DAG sowie Lyso-Verbindungen und Dolichol wurden nicht detektiert.

- Glioblastoma Multiforme (WHO IV):

Die lipophilen Extrakte der Glioblastome wiesen von den Tumoren die höchsten Gehalte an Cholesterol, CE und TAG auf und zeigten einen erhöhten Anteil der Linolsäure (18:2(n-6)) unter den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Verhältnis 18:2/PUFA 1:11). PE und Dolichol waren dagegen vermindert. In geringen Mengen wurden zudem Lyso-Phosphatidylcholine detektiert.

- Riesenzellglioblastom (WHO IV):

Die Lipide des Riesenzellglioblastoms ähnelten den Verteilungen der Glioblastome. Auch der Anteil der Linolsäure an den PUFA war mit einem Verhältnis von 1:10 ähnlich. Der Lipidextrakt enthielt lediglich mehr cholinhaltige Spezies und höhere Anteile an PE. Zudem wies es von den Tumoren den höchsten SPH-Gehalt auf, wenngleich die GS stark vermindert waren. Ebenso enthielt der Extrakt weniger CE.

- Anaplastisches Astrozytom (WHO III):

Das Lipidspektrum der anaplastischen Astrozytome zeigte von den Tumoren die höchsten Gehalte an Lyso-Phosphatidylcholinen und SPH/GS, wobei der SPH-Anteil bei Letzteren überwog. Die Plasmalogene wiesen den geringsten Gehalt auf und auch der Anteil an CE, PC und PE und ungesättigten Fettsäuren war geringer als bei den anderen Tumoren. TAG wurde nicht detektiert.

- Anaplastisches Oligodendrogliom (WHO III):

Der Lipidextrakt des Oligodendroglioms enthielt von den Tumoren die höchsten Gehalte an CE, PC und Fettsäuren (sowohl gesättigt als auch ungesättigt). DAG, Dolichol, SPH (Galactosylceramide waren nicht vorhanden) und Plasmalogene waren vermindert. Wie bei den anaplastischen Astrozytomen wurde kein TAG beobachtet. Auch Lyso-Verbindungen wurden nicht detektiert.

- Anaplastisches Oligoastrozytom (WHO III):

Wie im Extrakt des Oligodendroglioms wurden auch hier erhöhte Signale an PC und Fettsäuren detektiert. Dagegen war der CE-Gehalt und der DAG-Anteil wie bei den anaplastischen Astrozytomen vermindert. Ebenso wurde kein TAG identifiziert.

- Astrozytom:

Die lipophilen Extrakte der Astrozytome waren durch hohe Anteile an Plasmalogenen, PE und PC gekennzeichnet. Dagegen war der CE-Gehalt vermindert und es wurde nur wenig Linolsäure detektiert (Verhältnis 18:2/PUFA 1:21). Des Weiteren wurden in geringen Mengen lyso-Phosphatidylcholine identifiziert.

- Kraniopharyngeom:

Der Lipidextrakt des Kraniopharyngeoms unterschied sich von den anderen Tumoren durch einen hohen Anteil an Plasmalogenen, während die Fettsäuren (einschließlich der MUFA und PUFA), Phospho- und Sphingolipide die geringsten Werte aufwiesen. Auch hier wurde nur ein geringer Anteil der Linolsäure bestimmt (18:2/PUFA 1:19). Cholesterol lag dagegen in einem mittleren Bereich und das Dolicholsignal war leicht erhöht. CE, TAG und DAG wurden nicht detektiert.

- Hypophysenadenom:

Das Lipidspektrum des Hypophysenadenoms enthielt den höchsten Anteil an Dolichol und erhöhte Werte an Plasmalogenen und PUFA. Auch der Anteil der Linolsäure an den PUFA fiel mit einem Verhältnis von 1:6 am höchsten aus. Zudem wurden vermehrt TAG detektiert, während CE und DAG in einem mittleren Bereich lagen. Cholesterol wies dagegen den geringsten Wert unter den Tumoren auf.

Auch die Analyse der lipophilen Extrakte zeigte, dass die verschiedenen Tumortypen Unterschiede in ihren Lipidprofilen aufweisen. Bemerkenswert sind vor allem der hohe Dolicholgehalt und der große Anteil der Linolsäure im Hypophysenadenom. Der Anteil der Linolsäure an den PUFA nimmt innerhalb der astrozytären Tumoren von Grad III zu Grad IV zu und weist auf eine veränderte Fettsäurezusammensetzung hin. Die TAGs sind auf die hoch malignen Tumoren und das Hypophysenadenom beschränkt. Zu Letzterem ist keine Graduierung bekannt, das Vorkommen von TAG könnte jedoch ein Hinweis auf einen malignen Tumor darstellen.

Biochemische Hintergründe:

Einer der deutlichsten Unterschiede zwischen dem entfernten Randgebiet und den Tumoren lag im Fettsäuregehalt und dort im Besonderen bei den ungesättigten Fettsäuren. Im entfernten Randgebiet war vor allem der PUFA-Gehalt deutlich geringer, während das Verhältnis der Linolsäure zu den restlichen PUFA interessanterweise relativ ähnlich zu den malignen Glioblastomen und dem Riesenzellglioblastom war. Die Tumoren enthalten mehr Phospholipide und zusätzlich CE und TAG, folglich sind auch mehr Fettsäuren enthalten. Aufgrund der geringeren Werte des $Fa/\Delta CH_2\Delta$ -Verhältnisses in den Tumoren nimmt hier der PUFA-Anteil stark zu. In Gliomen ist zwar der Gehalt an Docosahexaensäure (DHA, 22:6(n-3)) vermindert, dafür sind die Konzentrationen an Linolsäure und Arachidonsäure (20:4(n-6)) erhöht^{[227],[228]}. Ist der Anstieg der ω -6 Fettsäuren entsprechend groß, wird der geringere DHA-Gehalt ausgeglichen bzw. überkompensiert. Dies spricht auch dafür, dass in den Glioblastomen und im Riesenzellglioblastom trotz der gleichen Linolsäureanteile eine andere Fettsäureverteilung als im Randgebiet vorliegt. Die verminderten Anteile der Linolsäure in den Grad III-Tumoren könnten durch eine geringere Abnahme der DHA bzw. einen geringeren Anstieg der Arachidon- oder Linolsäure hervorgerufen werden. Eine Überprüfung ist jedoch nur durch eine chromatographische Auftrennung möglich.

Die beobachtete Erhöhung der PUFA kann auf eine gesteigerte Membranfluidität der Tumoren zurückzuführen sein, welche aufgrund des infiltrativen Wachstums benötigt wird. Auf der anderen Seite kann der Anstieg auch in signalgebenden Prozessen begründet sein. Aus Linolsäure werden die verschiedenen Fettsäure-Vorstufen der Eicosanoide synthetisiert, darunter auch die in Gliomen erhöhte Arachidonsäure.

Aus der Arachidonsäure gebildete Eicosanoide modulieren entzündliche und angiogenetische Prozesse^[229]. Sie werden in Zusammenhang mit Tumorstadium und Migration gesetzt und gelten als Tumor-Promotoren. Beispielsweise ist das Prostaglandin E₂ in Gliomen erhöht^[228]. Die Arachidonsäure wird in Phospholipiden der Zellmembran gespeichert und bei Bedarf durch die Phospholipase A₂ freigesetzt. Die erhöhten Prostaglandin E₂-Gehalte können somit einen höheren Gehalt der PUFA (speziell 18:2 und 20:4) bedingen.

Das Auftreten von TAG und CE ausschließlich im Tumorgewebe wurde auch in anderen Studien beobachtet^{[69],[80],[132],[133],[230]}. Dabei korrelierte der Gehalt an TAG und CE mit der vaskulären Proliferationsrate^{[132],[133]}. Nygren et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass CE (und damit auch TAG) eher aus dem Serum durch *low density* Lipoproteine (LDL) aufgenommen wird als dass es selbst synthetisiert wird^[230]. Proliferierende Tumorzellen weisen zudem vermehrt LDL-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche auf^[80]. Damit sind CE und TAG charakteristisch für maligne Tumoren. *In vivo* wird zudem eine Zunahme der Lipidsignale in Tumoren beobachtet, welche durch die Bildung cytoplasmatischer Lipidtröpfchen hervorgerufen wird^[153]. Diese enthalten vornehmlich TAG und CE und können somit auch zu einer Erhöhung der Signale beitragen. TAG und CE dienen als Energiereserve und/oder als Speicher für die bei der Membranbiogenese benötigten Fettsäureketten und Cholesteroleinheiten^[231].

Der Cholesterolgehalt im entfernten Randgebiet war höher als in den Tumoren, unter denen die Glioblastome den höchsten Anteil aufwiesen. In der Literatur werden teilweise höhere^[230], teilweise niedrigere Cholesterolkonzentrationen^[80] im gesunden Gewebe beschrieben. Ausgehend von der nicht vorhandenen Feedback-Hemmung der HMG-CoA-Reduktase^[216], wären höhere Cholesterolgehalte in den Tumoren erwartet worden. Der erhöhte Cholesterolgehalt in den entfernten Randgebieten könnte durch myelinhaltige Strukturen hervorgerufen werden (vgl. Kapitel 2.2.1, S. 49). Yates et al. berichteten, dass der Cholesterolgehalt in Tumoren höher ist als in der grauen Substanz, nicht aber in der weißen Substanz^[232]. Ein Anstieg des Cholesterols in den Glioblastomen wurde auch anderen Studien beschrieben^{[80],[84]} und kann in Zusammenhang mit der nicht regulierten HMG-CoA-Reduktase-Aktivität stehen.

Das Hypophysenadenom entstammt neuroendokrinen Gewebe und weist damit einen hohen Dolicholgehalt auf. Dolichole sind u. a. an der Vesikelfusion beteiligt und sind somit in diesen Geweben erhöht. Auch in den anderen Tumoren wurden im Vergleich zum Randgebiet/entfernten Randgebiet erhöhte Gehalte detektiert (s. Abschnitt 2.2.2).

Die polaren Lipide mit Ausnahme der Sphingomyeline/Galactosylceramide und der Plasmalogene sind in den Tumoren höher konzentriert als im entfernten Randgebiet. Lediglich PE ist in den anaplastischen Astrozytomen und den Glioblastomen stärker erniedrigt als im entfernten Randgebiet. Das anaplastische Oligodendrogliom, die Oligoastrozytome und die Astrozytome weisen die höchsten PC-Gehalte auf. Die Verminderung der Sphingolipide in den Tumoren wird hauptsächlich durch die Abnahme der Galactosylceramide hervorgerufen (vgl. Abschnitt 2.2.1).

Eine Veränderung des SPH-Gehalts kann nicht ausgeschlossen werden, da der SPH-Gehalt aufgrund der Signalüberlagerungen bei Anwesenheit von GS nicht bestimmt wurde. In einer anderen Studie wurde jedoch ein leicht erhöhter SPH-Gehalt in astrozytären Tumoren beobachtet^[177]. Zudem beschrieben die Autoren ebenfalls einen geringeren Plasmalogengehalt in den malignen astrozytären Tumoren und auch die verminderten PE-Gehalte in den anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen werden bestätigt. Meist werden jedoch auch in anderen Tumoren niedrigere PE-Gehalte beschrieben^{[69],[72],[177]}. Auch bei den PC verhält es sich ähnlich: Die erhöhten PC-Gehalte in den Tumoren werden durch mehrere Studien bestätigt^{[72],[80],[132]}. Lehnhardt et al. detektierten jedoch bei den Glioblastomen die höchsten Werte^[72].

Die Phospholipide, vor allem PC, PE und auch Plasmalogene (im ZNS), sind Hauptbestandteile der Zellmembran, gleichzeitig dienen sie der Signalweiterleitung durch die Bildung von Second Messengern. In Tumoren ist PC vor allem durch den gesteigerten Bedarf an Membranbestandteilen erhöht, während PE vermutlich durch eine gesteigerte Hydrolyse zum Second Messenger DAG und Phosphoethanolamin reduziert wird^[177]. Der vermehrte Gehalt an Phosphoethanolamin in den hydrophilen Extrakten könnte diese These stützen. Plasmalogene treten vor allem vermehrt in den myelinhaltigen Zellen auf. Dies könnte ein Grund für den hohen Gehalt im entfernten Randgebiet sein. Zudem dienen sie als Speicher für Arachidonsäure^[233]. Damit sollten sie beispielsweise in den Glioblastomen erhöht sein, tatsächlich sind sie jedoch auch hier vermindert.

2.2.4 Fazit

Die Analyse der hydrophilen und lipophilen Extrakte hat gezeigt, dass die verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Profile aufweisen, welche bei den wasserlöslichen Komponenten stärker ausgeprägt sind als bei den Lipiden. Dies ist vermutlich auf einen aktiveren Stoffwechsel der hydrophilen Metabolite zurückzuführen. Im Vergleich zum entfernten Randgebiet zeigten die verschiedenen Tumoren in der Regel jedoch ähnliche Veränderungen mit Ausnahme einiger weniger Metabolite (bspw. myo-Inositol), so dass eine Zusammenfassung der verschiedenen Gliome zu einer Gruppe für die intratumorale Unterscheidung sinnvoll erscheint.

Generell müssen diese Ergebnisse jedoch über eine größere Probenanzahl statistisch abgesichert werden. Zudem muss einschränkend erwähnt werden, dass die Streuung nicht mit einbezogen wurde, da nicht für alle Entitäten genügend Proben vorhanden waren. Ist die Streuung hoch – wie es oft üblich ist in hoch malignen, heterogenen Tumoren – kann es sein, dass diese Unterschiede geringer ausfallen.

2.3 Mustererkennung

Mit Hilfe computergestützter Verfahren ist es möglich, inhärente metabolische Veränderungen in komplexen Gemischen zu analysieren. Dabei können Charakteristika identifiziert werden, die dem menschlichen Betrachter bspw. aufgrund der großen Intraklassenvarianz verborgen bleiben (vgl. Kapitel 1.5). In dieser Arbeit werden multivariate Analyseverfahren eingesetzt, um relevante hydrophile bzw. lipophile Metabolite für eine intratumorale Unterscheidung zu identifizieren. Das Ziel liegt dabei nicht in der Entwicklung und Optimierung eines robusten Klassifikators.

Es wurden aktives Tumorzentrum, Tumorrand und entferntes Randgebiet der malignen astrozytären Tumoren von WHO-Grad III und IV untersucht. Die Probenanzahl stellt dabei ein entscheidendes Kriterium dar, so dass maligne (WHO III) und hoch maligne (WHO IV) Biopsate in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Zudem zeigten diese im Vergleich zum entfernten Randgebiet überwiegend ähnliche Veränderungen in ihrem Metabolitenprofil (vgl. 2.2.3).

Im folgenden Abschnitt wird kurz die Vorgehensweise beschrieben. Darauf erfolgt die Vorstellung und Diskussion der Ergebnisse für die wasserlöslichen und die lipophilen Stoffwechselkomponenten.

2.3.1 Vorgehensweise

Für die Mustererkennung wurden die ^1H -NMR-Spektren der hydrophilen bzw. lipophilen Extrakte zunächst untereinander angeglichen (*peak alignment*), Lösungsmittelsignale etc. entfernt, auf das Gesamtintegral normiert und in signalangepasste Segmente (ohne Überlappung) unterteilt (vgl. Kapitel 5.7). Damit ergaben sich zwei Datensätze à 286 (hydrophil) bzw. 245 Variablen (lipophil), die getrennt voneinander analysiert wurden. Jedem Datensatz wurde zudem ein Klassifizierungsvektor zugeordnet, aus dem die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Proben hervorging.

Für die Analyse der intratumoralen metabolischen Veränderungen wurden drei verschiedene Verfahren eingesetzt:

Um zunächst zu bestimmen, welche der Komponenten für eine Unterscheidung wichtig sind, wurde eine PLS-Regression durchgeführt. Dabei können die relevanten Variablen (NMR-Signale) anhand der so genannten *Loading Weights* und Regressionskoeffizienten bestimmt werden. Zudem ist eine Visualisierung der Gruppenverteilung durch eine Auftragung der PLS-Faktoren in Score-Plots möglich.

Zusätzlich wurde eine LDA-Klassifikation eingesetzt, um die Variablen anhand ihrer Korrektklassifikationsraten (Treffgenauigkeit) bewerten und vergleichen zu können. Hierfür wurden die Variablen einzeln und in Kombinationen von mehreren Variablen für eine Klassifikation herangezogen.

Bei den Klassifikationsläufen mit mehreren Variablen wurde so vorgegangen, dass zunächst die Korrektklassifikationsraten für alle möglichen Zweier-Kombinationen berechnet wurden. Von diesen wurden die besten 15 ausgewählt, mit allen verbliebenen Variablen zu Dreier-Kombinationen zusammen gesetzt und die Korrektklassifikationsrate bestimmt. Anschließend wurden aus diesen Dreier-Kombinationen wiederum die besten Kombinationen ausgewählt und nochmals mit allen restlichen Variablen kombiniert usw. Dies erfolgte bis zu einer Zusammensetzung von fünf Variablen, da weitere Kombinationen das Klassifikationsergebnis nicht weiter verbesserten.

Die über diese beiden Verfahren als entscheidend eingestuften Variablen wurden anschließend überprüft. Über einen Abgleich mit den NMR-Spektren wurden nur die Variablen ausgewählt, denen auch Signale zugeordnet werden konnten. Somit wurden Rauschen oder andere Artefakte von der Analyse ausgeschlossen.

Die als wichtig erkannten und ggf. weitere, biochemisch relevante Metabolite wurden anschließend für eine zweite Visualisierung mittels selbstorganisierender Karten (SOMs) eingesetzt. Dieses Verfahren visualisiert neben einer Gruppenverteilung auch die Metabolitengehalte in den verschiedenen Gruppen/Extrakten. Damit ermöglichen die Karten einen schnell erfassbaren und informativen Überblick über die Konzentrationsverläufe in den verschiedenen Klassen und erlauben Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden biochemischen Abläufe.

Des Weiteren ist anzumerken, dass die Probenanzahl des entfernten Randgebiets mit $n = 4$ für eine statistische Analyse sehr gering ist. Kritisch ist, dass ein kleiner Satz an Proben durch eine große Anzahl an Variablen beschrieben wird. Zudem ist zu bedenken, dass diese Proben nicht unbedingt repräsentativ sein müssen. Andererseits beinhalten sie wichtige Informationen und sind für diese Fragestellung von großer biochemischer Relevanz. Deshalb werden die entfernten Randgebiete in die Analyse mit einbezogen.

2.3.2 Intratumorale Veränderungen der hydrophilen Komponenten

2.3.2.1 Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum, Tumorrandzone und entferntem Randgebiet

Mit Hilfe der PLS-Regression wurden bei den wasserlöslichen Extrakten 22 relevante Variablen bestimmt, welche den Signalen von NAA, Asparagin, Creatin, GSSG, Taurin, Threonin, Adenin und Uridindiphosphohexose (UDP-Hexose) entsprachen. Ebenso erwies sich der Spektralbereich zwischen 3.72 und 3.83 ppm als wichtig, in dem Resonanzen mehrerer Komponenten liegen. Neben Glucose- bzw. Galactosederivaten weisen ebenfalls verschiedene Aminosäuren Signale in diesem Bereich auf. Von GSSG, Taurin, Threonin und Adenin war jeweils nur ein Signal von mehreren entscheidend. Damit scheinen diese Verbindungen geringer gewichtet zu sein als NAA, Creatin und Asparagin, von denen alle Signale als relevant eingestuft wurden.

In einem weiteren Schritt wurde das PLS-Modell optimiert, indem nur die oben genannten relevanten Variablen für eine Berechnung berücksichtigt wurden. Der Score-Plot dieses Modells zeigt eine Aufteilung der drei Gewebearten in verschiedene räumliche Bereiche (Abbildung 32). Je näher die Proben aneinander liegen, desto ähnlicher ist ihr Metabolitenprofil. Sehr unterschiedliche Proben befinden sich demnach weit voneinander entfernt. Es ist eine Trennung von Tumorzentrum (Z, rote Kreise), Tumorrand (G, blaue Quadrate) und den entfernten Randproben (R, grüne Dreiecke) zu erkennen. Diese zeigt, dass die drei Gewebearten unterschiedliche Metabolitenprofile aufweisen. Lediglich einige Extrakte des Tumorrands liegen nah (G_{32GBM} , G_{18GBM}) oder im Bereich (G_{21RZG}) der Zentrumsproben. Dies beruht vermutlich auf höheren Anteilen an Tumorzellen, zumal alle drei Proben aus dem Randgewebe hoch maligner Tumoren stammen. Bei Extrakt G_{23GBM} verhält es sich dagegen umgekehrt. Hier scheint der Anteil an gesunden Zellen höher zu sein als bei den anderen Randproben. Aufgrund dieser leichten Vermischung der verschiedenen Gewebearten weist das Bestimmtheitsmaß R^2 des Modells einen Wert von 0.77 auf. Dies ist angesichts der biologischen Proben und der Fragestellung ein annehmbarer Wert.

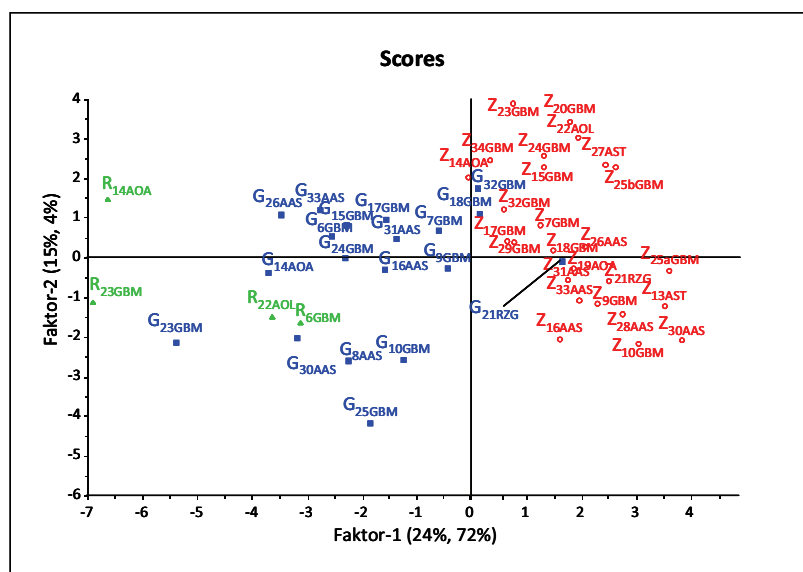


Abbildung 32: Der PLS-Score-Plot zeigt eine räumliche Aufteilung der verschiedenen Gewebearten aufgrund des unterschiedlichen Metabolitenprofils. Abkürzungen: Z (Tumorzentrum), G (Tumorrand), R (entf. Rand); AAS (anaplastisches Astrozytom III), AST (Astrozytom), AOA (anaplastisches Oligoastrozytom III), AOL (anaplastisches Oligodendrogliom III), GBM (Glioblastom IV), RZG (Riesenzellglioblastom IV).

Des Weiteren liegen die vier Proben des entfernten Randgebiets über einen größeren Bereich verstreut. Ein Vergleich der Spektren bestätigte, dass sich die Metabolitenprofile von R_{06GBM} und R_{22AOL} bzw. R_{14AOA} und R_{23GBM} ähneln und besonders bei den entscheidenden Gehalten von Creatin und N-acetylierten Verbindungen (NAA) differieren (siehe Abbildung 33).

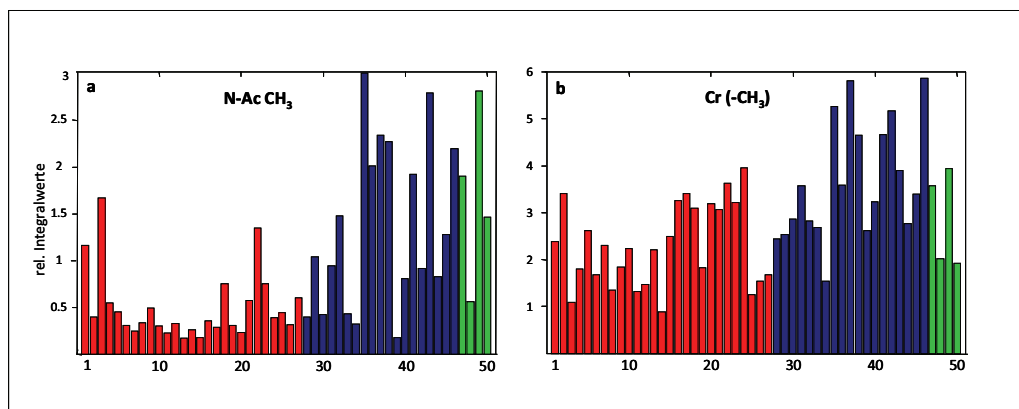


Abbildung 33: Histogramme der relativen Integralwerte von a) N-acetylierten Verbindungen (NAA) und b) Creatin im Tumorzentrum (rot, Proben 1-27), im Randgebiet (blau, Proben 28-46) und im entfernten Randgebiet (grün, Proben 47-50).

Wie es auch im Score-Plot dargestellt ist, gleichen R_{06GBM} (Probe 47) und R_{22AOL} (Probe 49) bei den Creatin- und NAA-Gehalten eher den Extrakten des Randgebiets. Aufgrund der höheren Anteile an gesunden Zellen in den Biopsaten des entfernten Randgebiets wäre eine homogenere Verteilung erwartet worden. Da sich die beiden Proben aus dem entf. Randgebiet der Glioblastome (R_{06GBM} und R_{23GBM}) unterscheiden, scheint die Tumorentität nicht entscheidend zu sein. R_{14AOA} und R_{23GBM} weisen zudem neben den metabolischen Differenzen im Vergleich zu R_{06GBM} und R_{22AOL} ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Dies könnte ebenfalls zu der unerwarteten Verteilung beitragen. Somit ist die Analyse weiterer Proben nötig, um diesen Gewebetyp besser abschätzen zu können.

LDA-Klassifikation

Die LDA-Klassifikation bestätigte und ergänzte die Resultate der PLS-Regression. Die Klassifikationsergebnisse der Einzelvariablen lagen dabei – wie zu erwarten – deutlich unter denen der Variablenkombinationen. Die besten Einzelvariablen erreichten eine Korrektorklassifikationsrate (KKR) von 58% bis 64% (siehe Tabelle 7). Der Höchstwert wurde dabei von einer Variablen erreicht, die sowohl Glutamat als auch eine Acetyl-Gruppe beinhaltet. Da die restlichen Glutamatsignale KKR von durchschnittlich 34% lieferten, ist die Acetyl-Gruppe für die Trennung der entscheidende Faktor. Durch einen Abgleich mit Datenbanken¹⁷ und der Literatur^[60] konnte diese dem Aminosucker N-Acetylgalactosamin (GalNAc) zugeordnet werden. Zudem erwiesen sich wie bei der PLS-Regression Adenin, Asparagin und NAA aber auch Aspartat und Acetat/GABA als relevant. Bei den Variablenkombinationen war eine Zusammenstellung aus N-Acetyl CH_3 (NAA)/ Asparagin 3/ Glycerol 1,3/ Ribose 1' mit je einer weiteren Variablen (Threonin 3, Ribose 5' bzw. Serin 3, GPCho 2,3) am erfolgreichsten.

¹⁷ Human Metabolome Data Base: URL: <http://www.hmdb.ca/> und Biological Magnetic Resonance Data Bank: URL: <http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>

Diese erreichten KKR von 91% bzw. 92%. Ebenso erwies sich eine Kombination von NAA 3/ Asparagin 3/ Glucose und Ribose 1' mit einer KKR von 88% als gut geeignet.

Vor allem mit den Variablenkombinationen werden gute Klassifikationsergebnisse für die Unterscheidung der drei Gewebelokalisationen erreicht. Dabei ist zu bedenken, dass die Klassifikationsgrenzen bei einer intratumoralen Unterscheidung im Gegensatz zu einer Klassifikation von verschiedenen Tumorentitäten aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse von Tumor- zu gesunden Zellen diffuser sind. Trotzdem sind sie mit Ergebnissen anderer Klassifikationsfragestellungen vergleichbar^{[62],[94],[180],[222]}.

Tabelle 7: Durchschnittliche Korrekt klassifikationsraten (gemittelt über 40 Klassifikationsläufe) von einzelnen Variablen und von Variablenkombinationen. Bei den Einzelvariablen erreichten teilweise mehrere Metabolite gleiche KKR. Zudem enthalten einige Variablen Resonanzen mehrerer Metabolite aufgrund von Signalüberlagerungen.

Korrekt klassifikationsraten zur Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum, Tumorrand und entferntem Randgebiet			
Einzelvariablen			
Rang	Metabolit	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrekt klassifikationsrate
1	Glutamat 3, GalNAc	2.04	64%
2	Adenin 8 Aspartat 3	8.45 2.82	61%
3	N-Ac CH ₃ (NAA)	2.01	60%
4	NAA 3	2.51	59%
5	Asparagin 3 Acetat/GABA 3 NAA 3	2.84 1.91 2.66	58%
Variablenkombinationen			
Rang	Metabolit	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrekt klassifikationsrate
1	N-Ac CH ₃ (NAA)/ Asparagin 3/ Glycerol 1,3/ Serin 3, GPCho 2,3/ Ribose 1'	2.01 2.84 3.56 3.96 6.11	92%
2	N-Ac CH ₃ (NAA)/ Asparagin 3/ Glycerol 1,3/ Threonin 3, Ribose 5'/ Ribose 1'	2.01 2.84 3.56 4.24 6.11	91%
3	NAA 3/ Asparagin 3/ Glucose/ Ribose 1'	2.67 2.84 3.45 6.11	88%

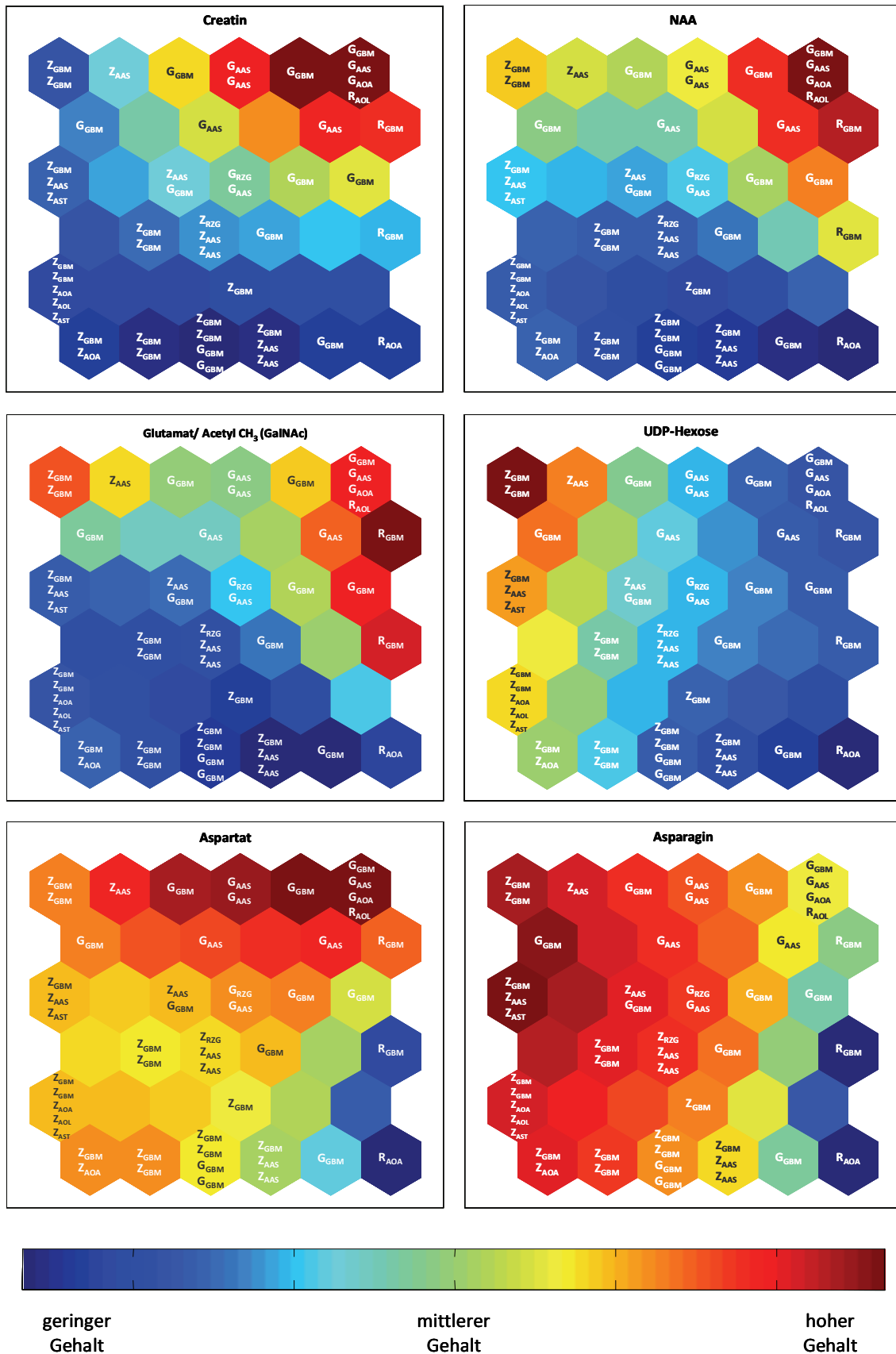


Abbildung 35: SOM-Repräsentationen der wichtigsten Metabolite für die Unterscheidung von aktivem Tumor (Z), Tumorrandzone (G) und entferntem Randgebiet (R). Blaue Farbtöne kennzeichnen einen geringen relativen Gehalt in den Extrakten, rote Farbtöne einen hohen relativen Gehalt (helle Flächen sind für einen stärkeren Kontrast dunkel beschriftet). Die Skalierung ist an den jeweiligen Metabolitengehalt angepasst.

Für NAA und Creatin weisen die Karten typische Verläufe auf: die Abnahme von NAA zum Tumorzentrum aufgrund der Verdrängung neuronaler Strukturen und die Verringerung des Creatin Gehalts durch den verschlechterten Energiestatus im Tumorgewebe. Die leicht erhöhten NAA-Werte in drei der Tumorzentrumsextrakte sind auf Einschlüsse gesunden Gewebes durch das infiltrative Wachstum zurückzuführen. Die Abnahme von Creatin und NAA zum Tumorzentrum stimmt mit früheren Arbeiten überein, in denen Tumorgewebe mit gesundem Gehirngewebe verglichen wurde^{[59],[125],[148]}. Auch in einer kürzlich erschienenen ¹H-MAS-NMR-Studie, in der die Unterschiede zwischen Tumorzentrum, Randgebiet und nekrotischen Bereichen herausgearbeitet wurden, wird von geringeren NAA- und Creatinwerten im Tumorzentrum berichtet^[195].

Die Ergebnisse der LDA und die SOM-Karte zeigen, dass das Signal der Acetyl-Gruppe von GalNAc für die Tumorabgrenzung von Bedeutung ist. GalNAc ist wichtiger Bestandteil in verschiedenen Glykoproteinen des Gehirns. Das Monosaccharid ist Vorläufer- bzw. Abbauprodukt der Glykokonjugate (Glykoproteine und -lipide) und kann in seiner aktivierten Form als Zuckernukleotid wieder in die Glykoprotein- und Glykolipidsynthese eintreten (siehe unten). Die verminderten Gehalte in den Tumorzentren könnten durch einen gesteigerten Bedarf an aktivierten Zuckern für die Glykolysierung hervorgerufen werden. Auch in einer kürzlich erschienenen *ex vivo* Studie an intakten HeLa-Zellen wurde GalNAc identifiziert^[234]. Hier sank der Gehalt an GalNAc während des Zellwachstums und stieg in konfluenten Zellen wieder an. Letzteres führten die Autoren auf eine verminderte Glykolysierung der Proteine im Vergleich zum Zellwachstum zurück.

Auch bei den aktivierten Zuckern wurden Veränderungen beobachtet, wenngleich die Karte der Uridindiphosphohexose keine offensichtliche Verteilung zeigt. Hier weisen nur einige Extrakte der Tumorzentren und zwei des Randgebiets einen erhöhten Gehalt auf. Der Konzentrationsverlauf basiert auf dem Signal der Uracilbase H6 bei 7.94 ppm. Es können mehrere Zuckernukleotide zu diesem Signal beitragen, darunter UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), UDP-N-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc) und die Zuckerderivate UDP-Glc und UDP-Gal. Unter diesen ist UDP-GlcNAc die Hauptkomponente, während UDP-GalNAc geringer konzentriert vorliegt. Die nicht acetylierten Verbindungen konnten dagegen nur in einigen hoch konzentrierten Extrakten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36). Da die aktivierten Zuckernukleotide in den Extrakten nur in geringer Konzentration auftreten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der gezeigte Konzentrationsverlauf in Abhängigkeit zur Einwaage der Proben steht. Bei kleinen Probenmengen liegen die aktivierten Zucker evtl. schon unter der Nachweisgrenze. In den gelb bis rot gekennzeichneten Waben liegen die Einwaagen der Proben zwischen 120 mg und 1,36 g, während der Großteil der Biopsate in den blauen Bereichen geringere Einwaagen aufweist.

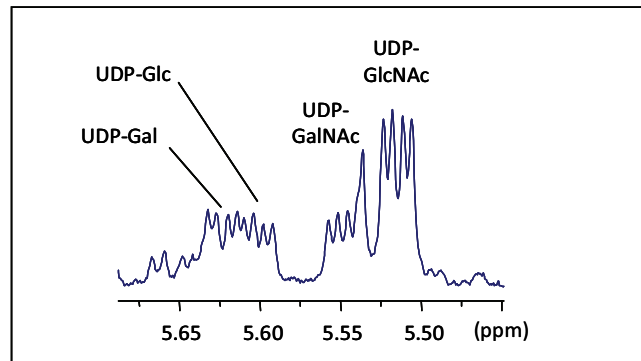


Abbildung 36: Im ^1H -NMR-Spektrum (Tumorzentrums-extrakt) weisen die H1-Protonen der verschiedenen UDP-Hexosen charakteristische Signalverschiebungen auf.

In einer früheren NMR-Studie wurden jedoch ebenfalls erhöhte Werte an UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc in Glioblastomen verzeichnet^[235] und auch bei Mamma-Karzinomen wurde eine Korrelation von UDP-Hexose mit der Malignität beobachtet^{[60],[84]}. Dies wurde mit dem Verlust der Zelldifferenzierung im Tumorgewebe in Verbindung gesetzt. Aus biochemischer Sicht spielen die aktivierten Zuckernukleotide eine wichtige Rolle. Sie sind u. a. an signalgebenden Prozessen und der Glykolysierung von Proteinen und Lipiden beteiligt. Damit könnten sie in Zusammenhang mit dem beobachteten Dolichol/Dolicholphosphat in den lipophilen Extrakten stehen (vgl. Kapitel 2.2.2): Bei der N-Glykolysierung von Proteinen wird ein GlcNAc-1-Phosphatrest (von UDP-GlcNAc) durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase auf ein in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankertes Dolicholphosphatmolekül transferiert. Dies erfolgt auf der cytosolischen Seite des ER. Anschließend werden weitere Zucker angeknüpft und das Glykolipid wird auf die luminal Seite des ER gedreht. Dort werden die Zuckerketten weiter modifiziert und schließlich auf die Proteine übertragen^[236]. In Glioblastomen sind die Glykoproteine (N-Glykane) verändert (vgl. Kapitel 2.2.2). Dies könnte sich auch in abnormen Gehalten der biologischen Vorstufen äußern.

Aspartat und Asparagin zeigen leicht gegensätzliche Verteilungen in den SOM-Karten. Während Asparagin eher in den Tumorzentren erhöht ist, werden höhere Aspartatgehalte in den Randgebieten detektiert. Die sehr niedrigen Gehalte der beiden Metabolite in fünf bzw. drei Proben auf der rechten Seite der Karte sind auf die gering konzentrierten Extrakte zurückzuführen (Biopsatgewicht < 85 mg), in denen nur die Hauptkomponenten identifiziert werden konnten. Die niedrigeren Aspartatkonzentrationen in den Tumorzentren stimmen mit anderen Studien überein, in denen Hirntumoren mit gesundem Gewebe verglichen wurden^{[59],[72],[237]}. Die Abnahme wurde auf die erhöhte Glykolyserate bzw. verminderte Citratzyklusaktivität in Tumoren zurückgeführt. Zudem zählt Aspartat zu den exzitatorischen Neurotransmittern und wird von Neuronen im Vergleich zu Gliazellen stärker exprimiert^[179]. Dies könnte ein weiterer Grund für den höheren Gehalt im Randgewebe sein.

Über Veränderungen im Asparaginhaushalt in Hirntumoren ist dagegen in NMR-spektroskopischen Studien bisher nichts bekannt. Asparagin wird durch Amidierung von Aspartat gebildet, katalysiert von der Asparagin-Synthetase.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer MAS-NMR Untersuchung, in der zudem die Expression der Kennedy-Stoffwechselweg-Gene analysiert wurde^[160]. Die erhöhten PCho-Gehalte konnten durch eine Expression des Cholin-Transporter-Gens, des Phospholipase-C-Gens (Katabolismus) und des Cholin kinase- β -Gens (Anabolismus) erklärt werden. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen auf einen höheren Umsatz an Phosphatidylcholin in den hoch malignen Tumoren. Ein insgesamt erhöhter tCho-Wert, wie er in anderen Studien beschrieben wird^{[59],[72],[123],[195]}, konnte dagegen nur in einigen Grad III-Tumoren beobachtet werden (s. Kapitel 2.2.3.1). Bei dieser Fragestellung eignet sich besonders das Verhältnis von GPCho zu PCho als Malignitätsmarker für die hoch malignen Tumoren.

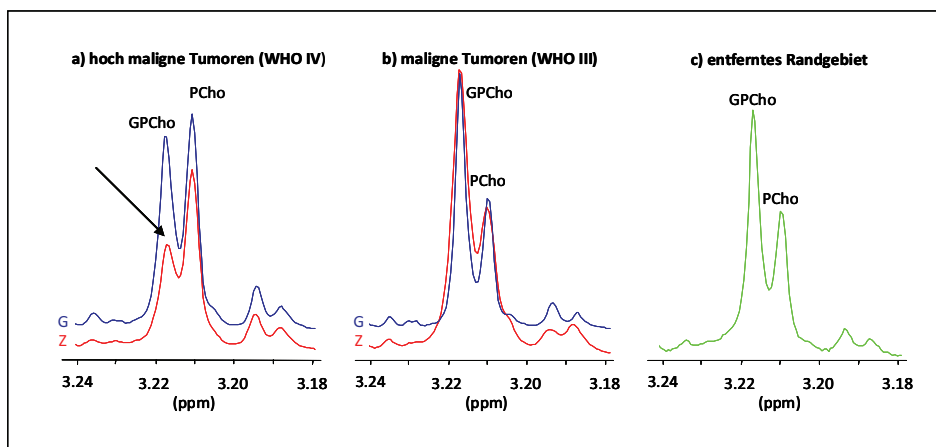


Abbildung 38: ¹H-NMR-Spektrenausschnitte der Cholinregion (Mittelwertspektren). Die Extrakte des Tumorzentrums (Z, rot) und des Randgebiets (G, blau) wurden hierfür in a) hoch maligne und b) maligne Tumoren unterteilt und gemittelt. Ebenso stellt Spektrum c) ein gemittelttes Spektrum der entf. Randgebiete dar. Nur in a) ist eine Verschiebung des GPCho-zu-PCho-Verhältnisses zwischen Zentrum und Randgebiet offensichtlich.

Die SOM-Karten von Acetat/GABA, Adenin und GSSG wiesen nur einen geringen Informationsgehalt auf und wurden deswegen nicht mit aufgeführt. Ein Abgleich mit den NMR-Spektren zeigte, dass bei Ersterer der Acetatgehalt entscheidend war. Dieser wies – genauso wie Adenin – nur in zwei Extrakten des entfernten Randgebiets erhöhte Werte auf und steht eher in Verbindung mit ischämischen Perioden während der Resektion (vgl. Kapitel 2.2.3.1, biochemische Hintergründe). Auch beim Adenin scheint ein biochemischer Hintergrund unwahrscheinlich. Hier liegt der Grund des relativ hohen Gehalts vermutlich in der geringen Konzentration der Proben und der Normierung auf das Gesamtintegral (s. Abschnitt 2.3.4). Im Gegensatz dazu zeigte GSSG eine eher zufällige Verteilung, die keinerlei Rückschlüsse auf die Gewebearten zuließ. Eigentlich wären erhöhte Werte aufgrund des höheren Zellstress in den Tumorzentren und auch in den Randgebieten erwartet worden. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine intratumorale Unterscheidung anhand der Metabolitenprofile zwischen entferntem Randgebiet, Tumorrandzone und aktivem Tumorzentrum möglich ist. Dabei sind vor allem die Gehalte an NAA, Creatin, Aspartat, Asparagin, GalNAc und UDP-Hexose (unter Vorbehalt, s.o.) entscheidend, ebenso das Verhältnis von PCho zu GPCCho für die Abgrenzung der hoch malignen Extrakte. Die entfernten Randgebiete wiesen (bis auf eine Ausnahme) geringe Konzentrationen auf und zeigten entgegen der Erwartung recht heterogene Metabolitenprofile, so dass die Analyse zusätzlicher Biopsate nötig ist. Die Hinzunahme weiterer biochemisch interessanter Metabolite (bspw. Alanin, Inositol, Glutamat, Glutamin, Succinat etc.) bei der SOM-Bildung führte zu einer schlechteren Verteilung der drei Gewebearten auf der Karte, so dass diese nicht mit einbezogen wurden. Aus diesen Gründen erfolgt für die hydrophilen Extrakte eine weitere Analyse, in der die Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Randzone herausgearbeitet werden. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.3.2.2 Unterscheidung aktives Tumorzentrum von Tumorrand

Für die Trennung von aktivem Tumorzentrum und Tumorrandzone sind nach der PLS-Regression mehrere Metabolite entscheidend. Wie bei der Unterscheidung der drei Gewebearten sind NAA, Creatin, GSSG, Taurin, der Signalbereich zwischen 3.72 und 3.81 ppm sowie UDP-Hexose relevant. Des Weiteren zählen auch Glutamat, Aspartat, Hypotaurin und Glycerol zu den signifikanten Komponenten. Auch hier wurde bei einigen Metaboliten jeweils nur ein Signal als relevant eingestuft, bspw. bei Taurin, Hypotaurin und Glutamat.

Das optimierte PLS-Modell zeigt eine fast klare Trennung von Tumorzentrum und Randgebiet (Abbildung 39), die deutlicher ist als in der Drei-Klassen-Unterscheidung. Lediglich G_{21RZG} und G_{32GBM} sind wie zuvor auch nahe der Tumorzentrumsextrakte lokalisiert. Ein Vergleich zum PLS-Plot zur Unterscheidung der drei Gewebearten (Abbildung 32) zeigt eine leicht abweichende Verteilung einzelner Proben. Dies beruht auf den zum Teil unterschiedlichen relevanten Variablen, anhand derer die gezeigten PLS-Modelle erstellt wurden. Zudem fällt auf, dass die Extrakte aus den Randgebieten der Glioblastome über einen größeren Bereich streuen als die aus den Randgebieten der Grad III-Tumoren. Damit scheinen diese ein heterogeneres Metabolitenprofil aufzuweisen.

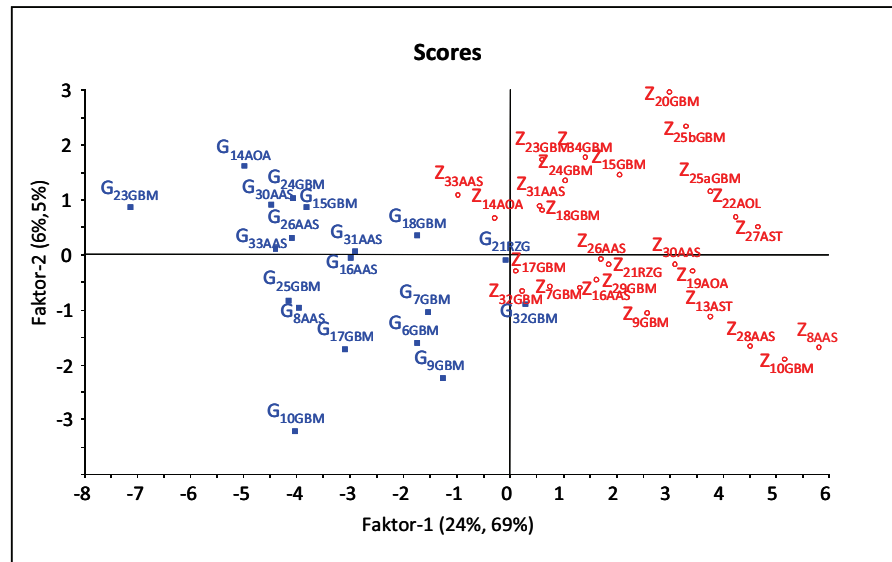


Abbildung 39: Im PLS-Score-Plot wird das unterschiedliche Metabolitenprofil von Tumorzentrum (Z, rote Kreise) und Tumorrand (G, blaue Quadrate) verdeutlicht. Dieser basiert auf den relevanten Variablen. Abkürzungen: AAS (anaplastisches Astrozytom III), AST (Astrozytom), AOA (anaplastisches Oligoastrozytom III), AOL (anaplastisches Oligodendrogliom III), GBM (Glioblastom IV), RZG (Riesenzellglioblastom IV).

Das Bestimmtheitsmaß R^2 des PLS-Modells liegt mit einem Wert von 0.76 im Bereich des ersten Modells. Da die entfernten Randgebiete nicht mit einbezogen wurden, wäre ein höherer Wert erwartet worden. Es zeigt sich, dass der Wert erheblich durch die Proben G_{21RZG} und G_{32GBM} beeinflusst wird. Werden diese aus dem Modell herausgenommen, so steigt das Bestimmtheitsmaß auf einen Wert von 0.89 an und weist damit einen sehr guten Wert auf.

LDA-Klassifikation

Die bessere Trennung der beiden Gruppen spiegelt sich auch in den Ergebnissen der LDA-Klassifikation wider. Hier wurden bei den Einzelvariablen KKR von bis zu 76% erreicht, bei den Variablenkombinationen bis zu 98% (siehe Tabelle 8). Dies entspricht einer Steigerung um 12% bzw. 6% verglichen mit der Klassifikation der drei Gewebearten.

Bei den Einzelvariablen erwies sich NAA als bester Metabolit für eine Unterscheidung. Mehrere Signalgruppen des NAA erreichten eine KKR von 76%. Die KKR der restlichen Resonanzen lagen nur wenig darunter (nicht mit aufgeführt). Ebenso wurden gute Klassifikationsergebnisse anhand des Glycerol-2-Signals erzielt (71% bzw. 69% für Glycerol 2/ PCho). Da die Klassifikation anhand der Cholin Kopfgruppe bei 3.21 ppm nur durchschnittliche Werte erzielte, scheint Glycerol auch bei 3.57 ppm ausschlaggebend zu sein. Des Weiteren wurden auch anhand von Arginin, Histidin/ Uridin, Leucin/ Lysin und Taurin gute KKR erreicht.

Bei den Variablenkombinationen erwies sich vor allem eine Zusammensetzung aus Creatin, Glucose und Serin/ Asparagin mit je einem weiteren Metabolit (Succinat, Valin bzw. GABA/Arginin) mit KKR von 97% bis 98% als sehr erfolgreich.

Es fällt auf, dass sich die besten Einzelmetaboliten von den besten Variablenkombinationen unterscheiden. Bei der Klassifikation anhand eines einzigen Metaboliten ist entscheidend, dass alle Gruppen gut durch diesen beschrieben werden. Werden Kombinationen von mehreren Metaboliten eingesetzt, so sind hier auch Komponenten vorteilhaft, die für eine bestimmte Gruppe der Proben charakteristisch sind.

Tabelle 8: Gemittelte Korrekt klassifikationsraten über 40 Klassifikationsläufe der Einzelmetabolite und der Kombinationen mehrerer Komponenten für die Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrand.

Korrektklassifikationsraten zur Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrand			
Einzelvariablen			
Rang	Metabolit	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrektklassifikationsrate
1	N-Acetyl CH ₃ (NAA)	2.01	76%
	NAA 3	2.51	
	NAA 3	2.66	
2	Glycerol 2	3.56	71%
3	Arginin 4	1.67	70%
	Histidin 6/ Uridin 6	7.86	
4	Leucin 3+4/Lysin 5	1.71	69%
	Tau (N)	3.43	
	PCho(-CH ₂ -N)/ Glycerol2	3.57	
Variablenkombinationen			
Rang	Metabolit	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrektklassifikationsrate
1	Creatin (CH ₃)/	3.03	98%
	Glucose /	3.49	
	Serin3, Asparagin2/	3.96	
	Succinat	2.39	
	Creatin (CH ₃)/	3.03	
	Glucose	3.44 - 3.49	
Serin 3, Asparagin 2/	3.96		
Valin 4	0.97		
2	Creatin (CH ₃)/	3.03	97%
	Glucose/	3.44 - 3.49	
	Serin 3, Asparagin 2/	3.96	
	GABA 3, Arginin 3	1.88	

Selbstorganisierende Karten

Die Kartenbelegung für die Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrandzone sowie die Konzentrationsverläufe der wichtigsten Metaboliten sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt. In den Karten sind die Extrakte der Tumorzentren in der oberen Hälfte der SOM bzw. in der linken unteren Ecke lokalisiert und von den Randgebieten getrennt, die sich vermehrt in der unteren Hälfte befinden. Lediglich drei Proben des Randgebiets wurden ebenfalls der oberen Hälfte zugeordnet. Zudem deutet sich eine Trennung der malignen (Grad III, vermehrt links unten) und hoch malignen Tumorproben (Grad IV, vermehrt rechts oben) an, welche auch auf die Extrakte des Randgebiets übertragen werden kann.

Bei den Visualisierungen wurde auf die erneute Darstellung von GalNAc, Creatin, NAA und Aspartat verzichtet, da ihre Konzentrationsverläufe den zuvor gezeigten vergleichbar sind. Auch bei dieser Fragestellung zeigten sie charakteristische Verteilungen.

Der Konzentrationsverlauf von Valin kann stellvertretend für die anderen BCAAs angesehen werden. Diese sind vorwiegend in den Tumorzentren der Glioblastome und auch in einigen ihrer Randgebiete erhöht. Auch Arginin und Alanin zeigen eine ähnlich charakteristische Verteilung. Alle drei Komponenten sind aufgrund des veränderten Energiestoffwechsels in den Tumorzellen erhöht (vgl. Kapitel 2.2.3.1). Der in der Literatur beschriebene Anstieg des Alanins mit der Malignisierung von Tumoren^{[72],[123]} bestätigt die hohen Alaninkonzentrationen in den Glioblastomextrakten. Der eindeutige Verlauf schließt eine Erhöhung durch ischämische Perioden aus, da diesen eine heterogenere Verteilung zugrunde liegen müsste. Inwiefern der Anstieg der drei Komponenten in den Randzonen auf einen erhöhten Anteil an Tumorzellen zurückzuführen ist oder auf einen unter Tumoreinfluss stehenden Stoffwechsel, ist schwer abzuschätzen. Bemerkenswert ist jedoch, dass alle Extrakte aus der Randzone der Tumoren von WHO-Grad III keine erhöhten Gehalte aufweisen.

Glutamin und Glutamat zeigen dagegen sehr unterschiedliche Konzentrationsverteilungen auf den Karten. Der Verlauf des Glutamats gleicht dem NAA- (vgl. Abbildung 35) und GABA-Verlauf (nicht gezeigt), wobei es nur in einigen Extrakten des Randgebiets erhöht ist. Die Korrelation zu diesen beiden Komponenten lässt einen höheren Anteil gesunder Zellen in diesen Proben vermuten. Im Gegensatz dazu weist Glutamin eine sehr heterogene Verteilung auf, aus der nur schwerlich ein Trend zu erkennen ist. Werden für das Tumorzentrum und die Randzone gemittelte Spektren erstellt, so liegt Glutamin in den Tumorzentren vermindert vor. Zudem wurde das Glutamat/Glutaminverhältnis für die verschiedenen Bereiche berechnet (nicht gezeigt). Hier trat jedoch keine Verschiebung zwischen Tumorzentrum und Randzone auf, wie es in anderen Studien im Vergleich zu gesundem Gewebe berichtet wurde^{[59],[72]}. Für weitere Informationen bezüglich des biochemischen Hintergrunds beider Komponenten wird auf Abschnitt 2.2.3.1 (biochemische Hintergründe) verwiesen.

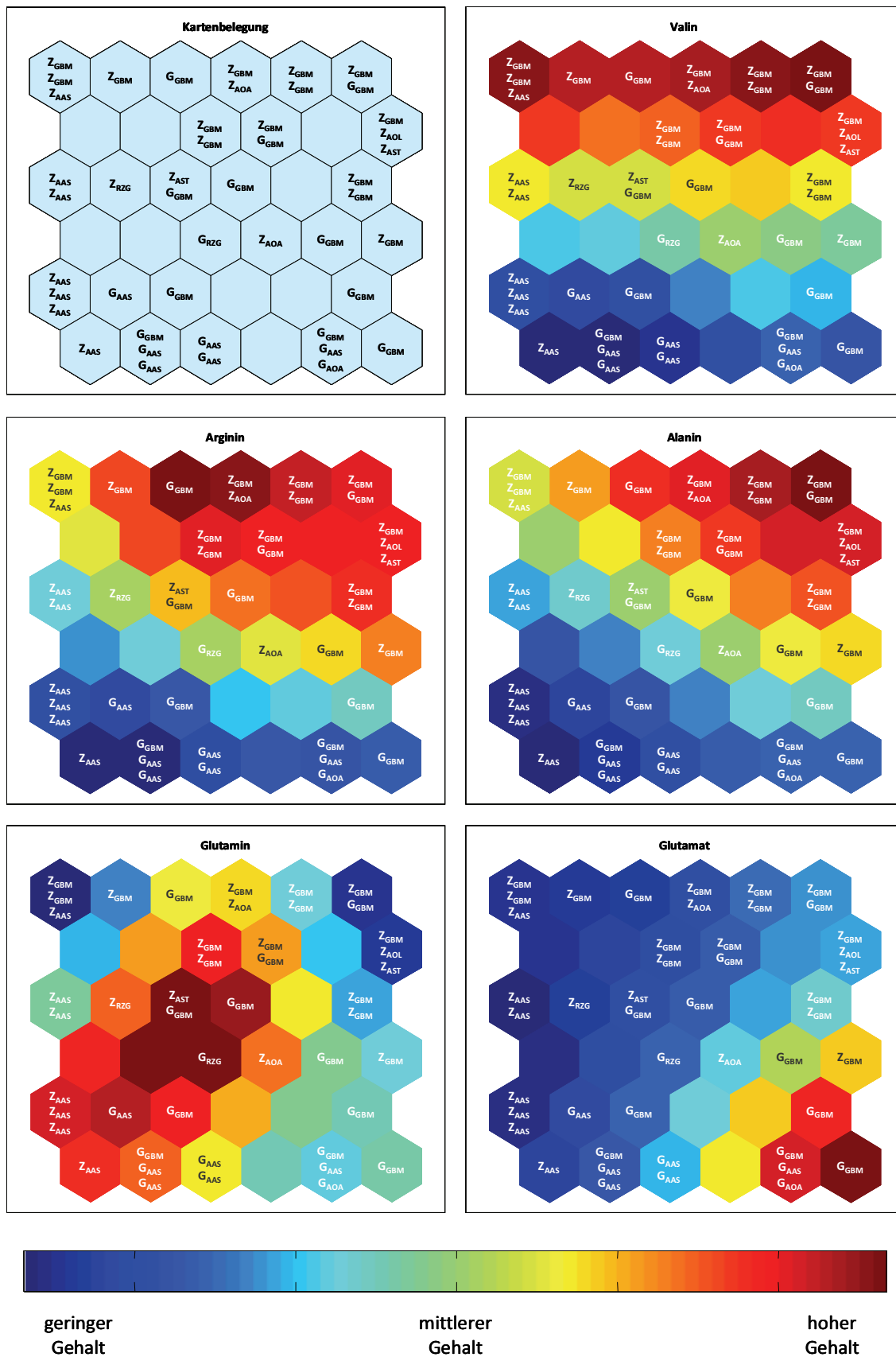


Abbildung 40: SOM-Karten zur Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum und Tumorrandzone. Die Farbverläufe sind an die jeweiligen Metabolitkonzentrationen angepasst.



Die Karten der Konzentrationsverläufe von scyllo- und myo-Inositol sind wiederum sehr aussagekräftig. Beide Komponenten sind besonders in den Grad III-Tumoren erhöht – sowohl im Zentrum als auch in der Randzone. Der Verlauf stimmt mit der Abnahme der Inositol-Isomere innerhalb der astrozytären Reihe überein^{[63],[149],[222]}. Dies geht auch aus den gemittelten Spektren hervor. Hier nimmt myo-Inositol von den Randgebieten der malignen Tumoren (Grad III) bis zu den hoch malignen Tumorzentrums-extrakten (Grad IV) ab (Abbildung 42). Dabei zeigt sich, dass die metabolischen Veränderungen in der Tumorrandzone spezifisch für die Tumoren sind, da der Gehalt in den entfernten Randgebieten (nicht eingezeichnet) zwischen den Grad III-Tumoren und den Grad IV-Randgebieten liegt. Die hohen Gehalte in den Randgebieten der malignen Tumoren (WHO III) könnten mit einem bereits beeinflussten Stoffwechsel in Verbindung stehen. Dies sollte jedoch durch die Analyse weiterer Proben abgesichert werden. Bei Glycin¹⁸ verhält es sich dagegen umgekehrt, es wird vermehrt in den hoch malignen Biopsaten detektiert. Die Abnahme von myo- und scyllo-Inositol und die Zunahme an Glycin mit dem Tumorgrad stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien^{[59],[72],[123],[148],[161],[239]}. Damit eignet sich das myo-Inositol-zu-Glycin-Verhältnis besonders für die Unterscheidung von malignen zu hoch malignen Tumoren^[161] und es scheint ebenso für die Abgrenzung der malignen Tumoren relevant zu sein.

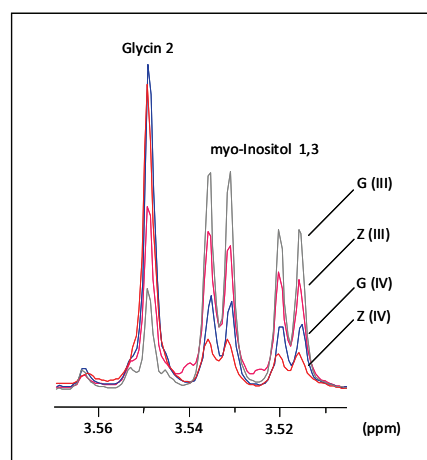


Abbildung 42: ¹H-NMR-Spektrumsausschnitt von myo-Inositol und Glycin. Die Spektren wurden jeweils nach Tumorgrad (III oder IV) und nach Gewebelokalisation (Zentrum oder Randgebiet) unterteilt und gemittelt.

Auch Taurin und seine biologische Vorstufe Hypotaurin zeigen charakteristische Konzentrationsverläufe. Taurin gilt als Malignitätsmarker (vgl. Kapitel 2.2.3.1), tatsächlich ist es jedoch in den Grad III-Tumoren sowohl im Zentrum als auch im Randgebiet erhöht. Hypotaurin tritt dagegen vermehrt in den Extrakten der hoch malignen Tumorzentren und in einigen Extrakten der Randgebiete auf.

¹⁸ Die SOM-Karte des Glycins wurde von zwei Extrakten dominiert, die sehr hohe Konzentrationen an Glycin enthielten, so dass Veränderungen zwischen den anderen Extrakten verdeckt wurden. Somit wurde sie nicht in die Abbildungen eingefügt.

Wright et al. detektierten in MAS-Spektren ebenfalls höhere Taurinkonzentrationen in Astrozytomen (WHO III) verglichen mit Glioblastomen und umgekehrt höhere Hypotaurinkonzentrationen in Glioblastomen^[163]. Auch die ähnlichen Gehalte von Taurin in den Glioblastomextrakten und ihren Randgebieten werden durch eine chromatographische Studie bestätigt^[240]. Die Konzentrationsverläufe der beiden Komponenten geben Hinweise darauf, dass Hypotaurin in den hoch malignen Extrakten zu Lasten des Taurins erhöht sein könnte. Letzteres wird als Antioxidans diskutiert, so dass die hohen Gehalte in den Glioblastomen als Schutz dienen könnten.

Das Konzentrationsprofil des (freien) Glycerols zeigt, dass es hauptsächlich in den anaplastischen Astrozytomen (AAS) in erhöhten Konzentrationen auftritt und in den restlichen Extrakten nur in geringen Mengen detektiert wird. In der Literatur wurde bisher nicht über erhöhte Glycerolwerte in AAS berichtet. Da nur eine relativ geringe Anzahl an AAS (n=7) untersucht wurde, sollte diese Beobachtung anhand weiterer Proben abgesichert werden.

Succinat zeigt dagegen einen weniger charakteristischen Verlauf. Es weist vorwiegend in den Extrakten der hoch malignen Tumorzentren und auch in einigen Tumorrandzonen einen erhöhten Gehalt auf. Im Vergleich zum entfernten Randgebiet waren die Werte jedoch geringer. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur^{[59],[163]}. Hier deutet sich zwar auch ein Unterschied zwischen den Randgebieten der malignen und hoch malignen Tumoren an, für die Tumorabgrenzung scheint es jedoch weniger geeignet zu sein.

Die Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrandzone bestätigt die zuvor als relevant bestimmten Stoffwechselkomponenten. Zudem sind auch die BCAAs, Alanin, Arginin, myo- und scyllo-Inositol, Glutamat, Glycin, Taurin und Hypotaurin entscheidend. Es zeigt sich, dass sich bestimmte Metabolitkonzentrationen in den Randgebieten von Grad III- und Grad IV-Tumoren unterscheiden und ein tumorspezifisches Profil aufweisen. Dies könnte dazu geführt haben, dass sich diese Metabolite nicht für die Unterscheidung der drei Gewebearten eignen.

2.3.3 Intratumorale Veränderungen der Lipide

Bei den Lipiden wurden anhand der PLS-Regression über 90 relevante Variablen bestimmt. Die große Anzahl ist dabei durch die molekulare Struktur der Lipide bedingt. Im Gegensatz zu den hydrophilen Metaboliten weisen die Lipide ein großes Grundgerüst auf, so dass sie eine Vielzahl an Signalen im ¹H-NMR-Spektrum hervorrufen. Für eine Unterscheidung als wichtig eingestuft wurden Cholesterol, CE, PC, PE, GS, SPH, Dolichol(-phosphat)¹⁹, TAG und Plasmalogene sowie die Signale der Fettsäureketten (α -, β -, Δ -1, Δ -CH₂- Δ - Methylengruppen sowie die olefinischen Protonen der ungesättigten Fettsäuren).

¹⁹ Im Folgenden wird Dolichol synonym für Dolichol und Dolicholphosphat verwendet.

Des Weiteren wurden auch Arachidon- und Linolsäure als relevant markiert, welche aufgrund spezifischer Verschiebungen separat detektiert werden können^[201].

Der Score-Plot des anhand der relevanten Variablen erstellten PLS-Modells zeigt auch bei den Lipiden eine Trennung der verschiedenen intratumoralen Gewebearten (siehe Abbildung 43). Im Vergleich zu den hydrophilen Extrakten scheinen die Grenzen diffuser zu sein, da die Überlappung besonders zwischen den Extrakten der Tumorzentren und den Randzonen größer ist. Somit weist das PLS-Modell ein etwas geringeres Bestimmtheitsmaß von 0.68 auf. Die entfernten Randgebiete zeigen dagegen - so wie es erwartet worden ist - eine geringere Streuung und damit ein einheitlicheres Lipidprofil. Zudem weisen sie im Gegensatz zu den wasserlöslichen Metaboliten ein zu den restlichen Gewebearten vergleichbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf.

Wie im PLS-Score-Plot der hydrophilen Extrakte liegen die Proben G_{18GBM} und G_{32GBM} im Bereich der Tumorzentren. Dies belegt die aufgestellte Hypothese, dass die beiden Proben einen größeren Anteil an Tumorzellen aufweisen. Für G_{21RZG} kann dies dagegen nicht bestätigt werden. Zudem fällt auf, dass die Proben Z_{31AAS} und Z_{33AAS} von den restlichen Extrakten der Tumorzentren abgesondert liegen. Im Vergleich zu den restlichen Zentrumsproben weisen ihre Extrakte weniger ω -3 Fettsäuren, CE, PC, PE, PUFA und Plasmalogene auf. Cholesterol und GS sind dagegen leicht erhöht. Somit ähneln sie in einigen Charakteristika den Extrakten der Tumorrandzone.

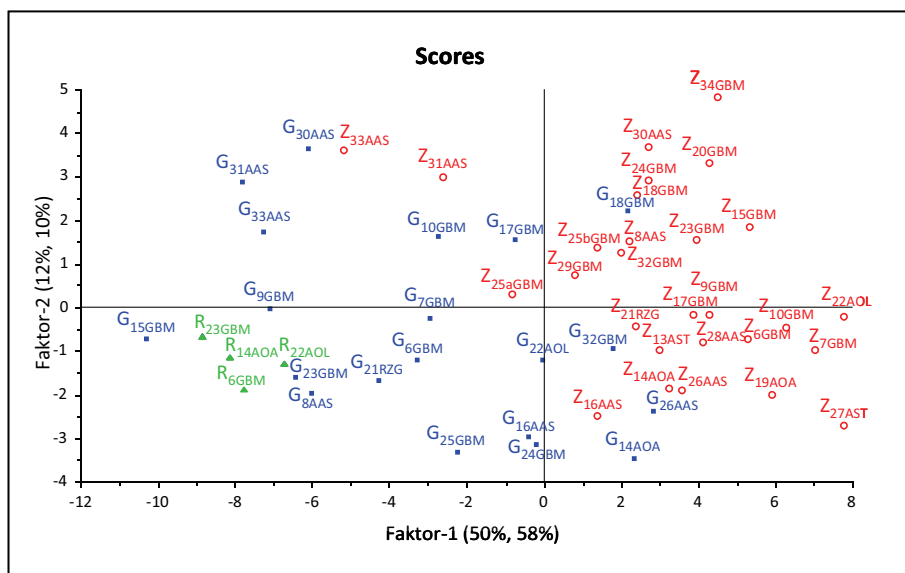


Abbildung 43: Im PLS-Score-Plot ist eine Separierung von Tumorzentrum (Z, rote Kreise), Tumorrandzone (G, blaue Quadrate) und entferntem Randgebiet (R, grüne Dreiecke) zu erkennen.

LDA-Klassifikation

Bei der Unterscheidung der drei Gewebearten wiesen unter den Lipiden die β -Methylenprotonen der Fettsäureseitenketten sowie die GS mit einer KKR von 69% die größte Relevanz auf. Ebenso eigneten sich die FA α -Methylenprotonen, Dolichol, Cholesterol, CE und Plasmalogene mit einer KKR von 68% bzw. 66% (Tabelle 9).

Durch die Kombination mehrerer Komponenten konnte auch hier die Anzahl der richtig klassifizierten Proben weiter gesteigert werden. Es erwies sich eine Zusammensetzung aus GS und einer Variablen, die Resonanzen verschiedener Lipide beinhaltet (PC γ , TAG $\alpha + \gamma$ und SPH α), zusammen mit SPH/GS F(N) α bzw. GS ϵ als am besten geeignet. Mit diesen Kombinationen wurden 84% bzw. 83% der Gewebeproben richtig klassifiziert. Eine KKR von 82% wurde mit der Kombination aus Arachidonsäure, PC, Plasmalogen und TAG erreicht. Eine Zusammensetzung mit mehr als drei Variablen brachte keine Verbesserungen.

Tabelle 9: Gemittelte Korrektklassifikationsraten der Einzelvariablen und der Variablenkombinationen. Einige Variablen enthalten Signale mehrerer Komponenten bzw. erreichten verschiedene Variablen die gleichen Ergebnisse.

Korrektklassifikationsraten zur Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum, Tumorrand und entferntem Randgebiet			
Einzelvariablen			
Rang	Lipid	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrektklassifikationsrate
1	FA β	1.61	69%
	GS (Gal)	3.81	
2	FA α	2.31	68%
	GS (Gal)	3.84	
3	Dolichol	1.67	66%
	C/ CE 4	2.26	
	PE (plas)	3.86	
Variablenkombinationen			
Rang	Lipid	Chem. Verschiebung δ [ppm]	Korrektklassifikationsrate
1	GS (Gal)/	3.81	84%
	PC γ , TAG $\alpha + \gamma$, SPH α	4.13	
	SPH/GS F(N) α	2.15	
2	GS (Gal)/	3.81	83%
	PC γ , TAG $\alpha + \gamma$, SPH α	4.13	
	GS ϵ	5.76	
3	20:4/	2.11	82%
	PC α , PE(plas) α /	3.98	
	TAG β	5.27	

Vor allem die GS scheinen für eine Zuordnung der Proben entscheidend zu sein, da sie sowohl bei den Einzelvariablen als auch bei den Kombinationen wichtig sind. Zudem fällt auf, dass mit den Einzelvariablen bei den Lipiden höhere Werte erreicht werden als bei den wasserlöslichen Extrakten (69% gegenüber 64%). Bei den Variablenkombinationen verhält es sich dagegen umgekehrt (84% gegenüber 92%). Diese Werte sind vergleichbar mit einer anderen Arbeit, in der ebenfalls anhand der (¹H-NMR-) Lipidspektren Klassifikationsfragestellungen bearbeitet wurden^[222]. Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse der LDA die als relevant markierten Variablen aus der PLS-Regression und die zuvor beschriebenen Unterschiede im SPH-, GS- und Dolicholgehalt.

Selbstorganisierende Karten

Für die Bildung der SOM wurden die für eine Unterscheidung relevantesten Lipide ausgewählt. Mit diesen wurde eine deutliche Trennung der drei Gewebearten erreicht (Abbildung 44). Ebenso spiegeln sich die homogenen Lipidprofile der entfernten Randgebiete in der Kartenbelegung wider. Diese sind auf zwei Knoten verteilt (links unten), zusammen mit drei Proben der Tumorrandzone. Die restlichen Extrakte der Randgebiete befinden sich ebenfalls vermehrt in der unteren Hälfte, während die Extrakte der Tumorzentren in der oberen Hälfte lokalisiert sind. Wie im PLS-Plot grenzen sich Z_{31AAS} und Z_{33AAS} (rechts unten, nicht beschriftet) von den restlichen Extrakten der Tumoren ab. Ebenso ist eine leichte Überschneidung zwischen den Tumorzentren und den Randgebieten im mittleren Bereich der SOM auszumachen sowie eine Ballung der hoch malignen Glioblastome in der oberen rechten Hälfte. Die Verteilung der Karte repräsentiert somit die mit der steigenden Malignisierung einhergehenden Änderungen im Lipidprofil vom entfernten Randgebiet bis zu den Tumorzentren der hoch malignen Tumoren.

Die anderen Karten zeigen die Konzentrationsprofile der wichtigsten polaren Lipide. Der zuvor schon beschriebene unterschiedliche Gehalt an GS in den Extrakten wird von der SOM-Karte bestätigt. Diese zeigt eine hohe Konzentration an GS in den entfernten Randgebieten und in einigen Extrakten der Tumorrandzone verglichen mit den Tumorzentren. Die guten LDA-Klassifikationsergebnisse der GS werden durch die charakteristische Verteilung auf der SOM verdeutlicht. Die erhöhten GS-Gehalte können durch Myelinanteile in den entsprechenden Extrakten hervorgerufen werden. Ein veränderter Sphingolipidmetabolismus ist jedoch auch denkbar (vgl. 2.2.1). Für SPH konnte dagegen keine SOM erstellt werden, da sich die Signalverschiebungen größtenteils mit denen der GS überschneiden bzw. durch andere Lipide überlagert sind. Auch aus der SOM von GS/SPH ϵ (nicht gezeigt) konnte keine Information erhalten werden, diese gleicht der Verteilung der GS.

Im Gegensatz zu den GS sind die Glycerophospholipide, zu denen hauptsächlich PC und PE beitragen, besonders in den Extrakten der malignen Tumoren (Grad III) erhöht. Ein Abgleich mit den ¹H-NMR-Spektren zeigte, dass dies durch gestiegene PC-Gehalte hervorgerufen wird. PE ist dagegen in den Tumorzentren vermindert (vgl. 2.2.3.2).

Auch die restlichen Extrakte enthielten mehr PC als die entfernten Randgebiete. Dies wird jedoch in der Karte von den sehr hohen Konzentrationen in den Grad III-Tumoren überdeckt. Auch in anderen Studien wurden in Tumoren größere PC-Gehalte verglichen zu gesundem Gewebe detektiert. Meist wiesen die Glioblastome jedoch höhere Werte auf^{[69],[72],[80],[177]}. Hohe PC-Konzentrationen werden mit der Bildung von sekundären Botenstoffen und einem gesteigerten Umsatz und Bedarf an Membranlipiden in Verbindung gebracht (vgl. 2.2.3.2, biochemische Hintergründe). Die Abnahme zu den entfernten Randgebieten reflektiert somit die geringere metabolische Aktivität.

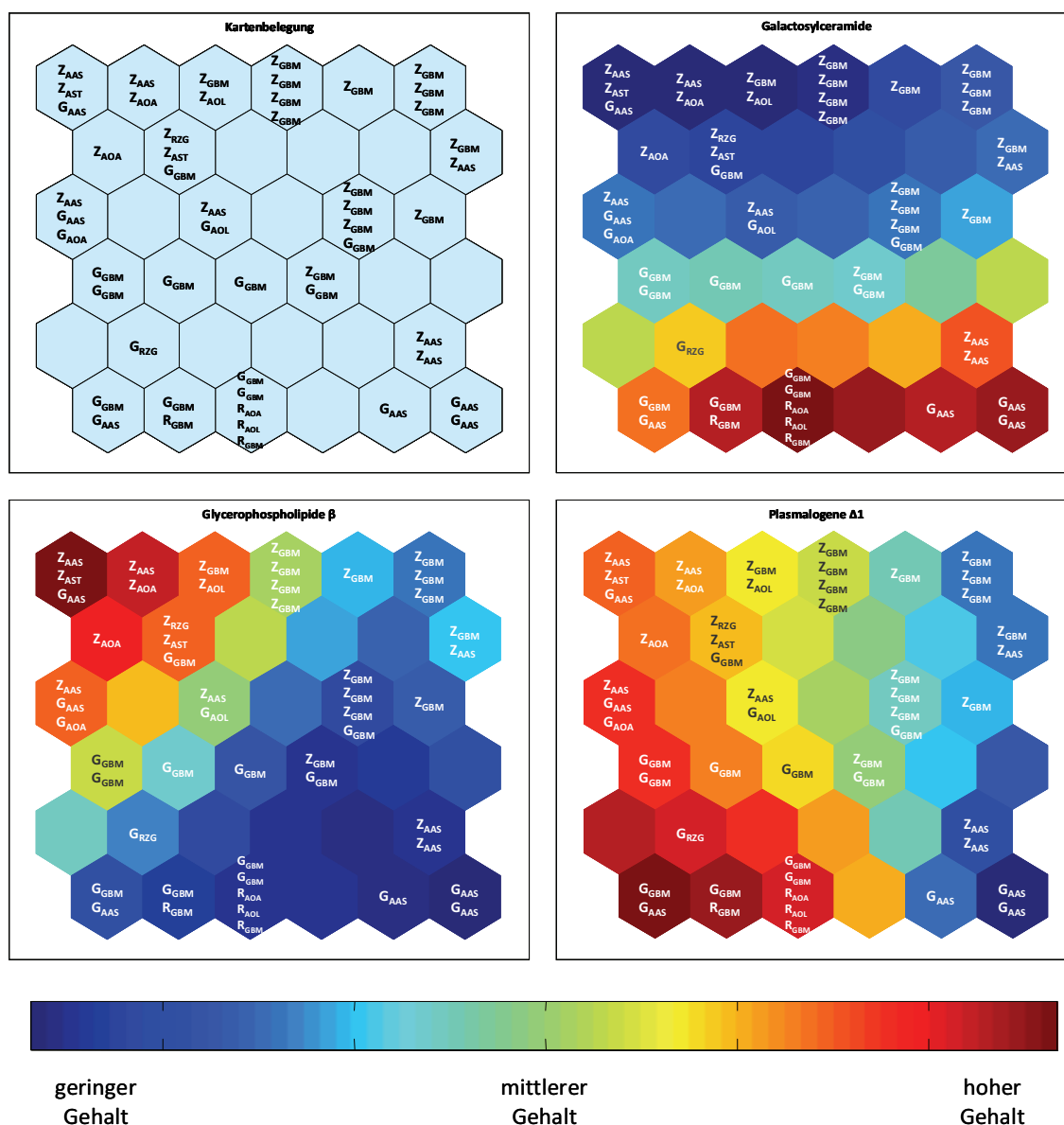


Abbildung 44: Kartenbelegung und SOM-Repräsentationen der wichtigsten polaren Lipide. Blaue Flächen kennzeichnen einen geringen relativen Gehalt, rote Flächen einen hohen relativen Gehalt.

Die Plasmalogene sind dagegen in den entfernten Randgebieten und den Tumorrandzonen erhöht, ebenso wie in einigen Tumorzentren - allerdings in geringerem Maße. Vor allem in den hoch malignen Tumoren weisen sie nur eine geringe Konzentration auf. Im Vergleich zu den anderen Lipiden scheint ihr Konzentrationsprofil jedoch für eine intratumorale Unterscheidung weniger geeignet zu sein.

Neben den polaren Lipiden zeigen auch die neutralen Lipide charakteristische Verläufe in den Karten (siehe Abbildung 45). Cholesterol wird ebenso wie die GS in den Tumorrandzonen und den entfernten Randgebieten in größeren Mengen detektiert. Auch die gemittelten ^1H -NMR-Spektren der drei Gewebearten zeigen einen Cholesterolanstieg von den Tumorzentren über die Randzonen zu den entfernten Randgebieten. Dies kann zusammen mit den erhöhten GS-Gehalten und den trotz geringer Einwaage guten Lipidausbeuten dieser Extrakte einen Hinweis auf das Vorhandensein myelinhaltiger Strukturen in den entf. Randgebieten darstellen (vgl. Kapitel 2.2.1, S. 49 und Kapitel 2.2.3.2, S. 71).

Dolichol hingegen weist in den Tumorzentren (vor allem in den Grad III-Tumoren) und in einigen Tumorrandzonen eine erhöhte Konzentration auf. Die SOM bestätigt daher die zuvor beschriebene Beobachtung, dass Dolichol bevorzugt in den Tumorzentren auftritt (vgl. 2.2.1). Für eine biochemische Interpretation sei auf das Kapitel 2.2.2 verwiesen. Aufgrund der gegensätzlichen Konzentrationsprofile von Dolichol und Cholesterol eignet sich besonders das Verhältnis von beiden Metaboliten für eine Klassifizierung der Proben. So liegt die KKR des Cholesterol-/Dolichol-Verhältnisses bei 72% im Vergleich zu 66% für Dolichol allein.

Ebenso zeigen CE und TAG charakteristische Verläufe in den Karten. Beide Lipidklassen treten bevorzugt in den Tumorzentren auf, wobei TAG bis auf eine Ausnahme (Z_{AAS}) nur in den Glioblastomextrakten zu detektieren sind. Damit zeigen die TAG eine spezifischere Verteilung als die CE. Zudem wurden sie nur in drei von zwanzig Extrakten der Tumorrandzonen detektiert, während neun von zwanzig Extrakten auch CE beinhalten. Diese Extrakte weisen insgesamt ein tumorähnlicheres Profil auf, so dass sie mehr Tumorzellen zu enthalten scheinen. In den entfernten Randgebieten wurden TAG und CE nicht detektiert. Erhöhte CE- und TAG-Gehalte ausschließlich in Tumoren werden durch die Literatur bestätigt und mit cytoplasmatischen Lipidtröpfchen und der Neubildung von Gefäßen durch das Tumorstadium in Verbindung gebracht (vgl. 2.2.3.2). Beide Komponenten sind typische Malignitätsmarker.

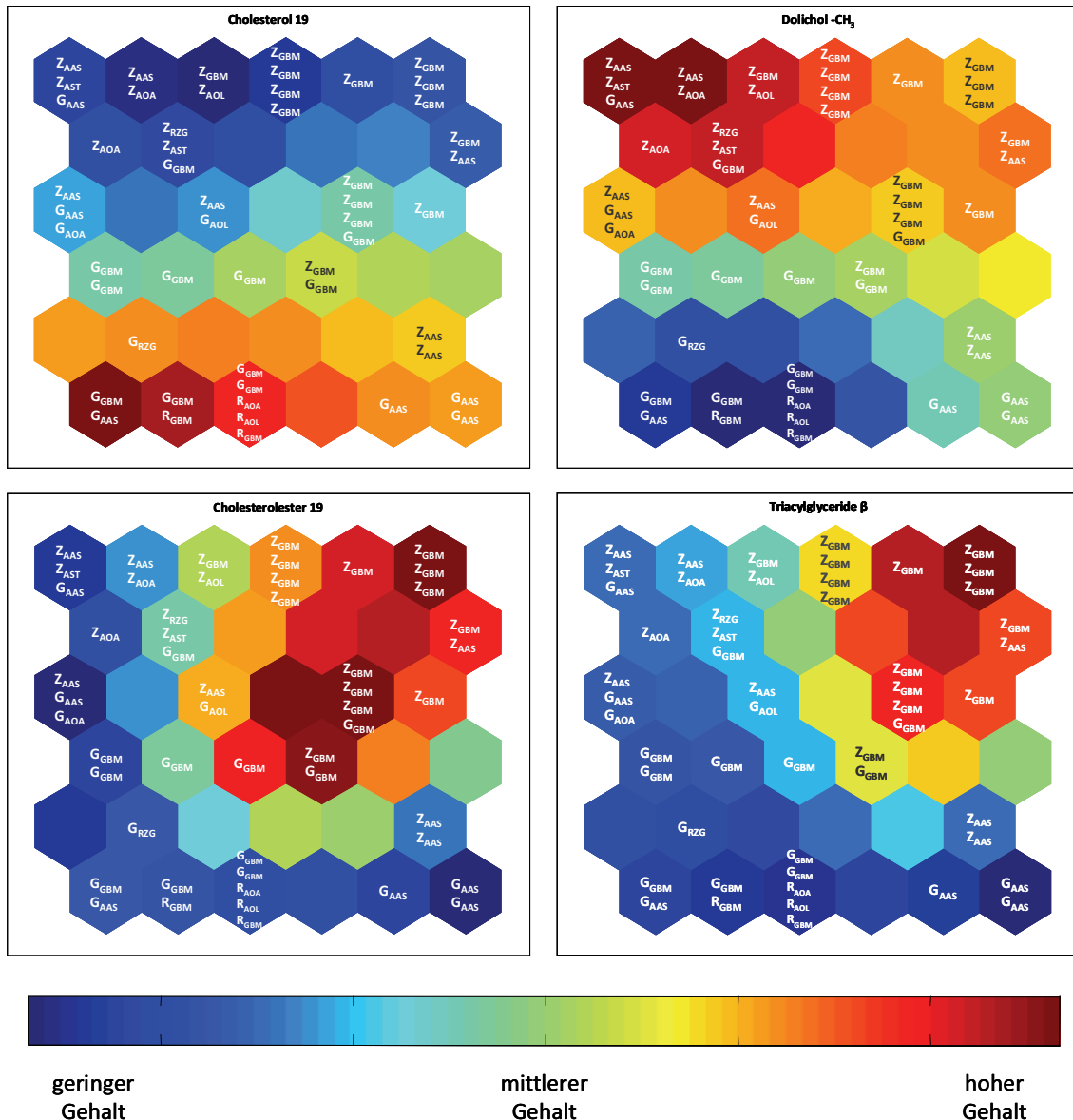
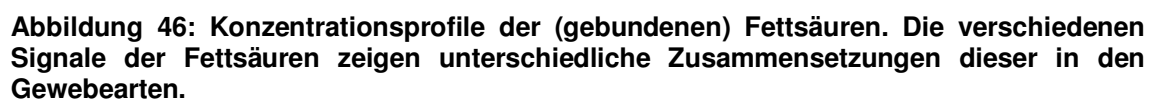


Abbildung 45: SOM-Karten der neutralen Lipide. Cholesterol, Dolichol, CE und TAG zeigen charakteristische Verteilungen.

Neben unterschiedlichen Verteilungen der polaren und neutralen Lipide ist auch die Zusammensetzungen der Fettsäurereste in den Lipidextrakten der drei Gewebearten verändert (siehe Abbildung 46). Anhand des Konzentrationsverlaufs der β -Methylenprotonen (FA β) kann der insgesamt vorliegende Gehalt an Fettsäuren verglichen werden. Besonders in den Tumorzentren und einigen Randgebieten sind die Werte erhöht. Dies liegt u. a. an TAG und CE, die nur in diesen Proben zu detektieren sind und eine bzw. drei Acylreste in ihrem Grundgerüst aufweisen. Zudem trägt auch der erhöhte PC-Gehalt in einigen der Tumorextrakte dazu bei, da PC unter den Phospholipiden die Hauptkomponente ist. Die Veränderungen von GS, den Plasmalogenen und SPH werden in geringerem Maße an dieser Verteilung teilhaben. Das charakteristische Profil in der SOM spiegelt die hohe KKR für FA β unter den Einzelvariablen wider.



Die Konzentrationsprofile der (bis-)allylischen Methylenprotonen (FA Δ -1 und FA Δ -CH₂- Δ) lassen Rückschlüsse auf den Anteil der ungesättigten Fettsäuren in den Lipidextrakten zu. Die Δ -1-Signale repräsentieren die einfach ungesättigten Fettsäuren²⁰, während die Δ -CH₂- Δ -Resonanzen die PUFA Fraktion (ohne Linolsäure) in den Proben wiedergeben. Es zeigt sich, dass in den entfernten Randgebieten und den Tumorrandozonen die MUFA- Δ -1-Signale erhöht sind, während die PUFA in den Tumorzentren (vor allem in den Grad III-Tumoren) höher konzentriert sind. Erstere sind zudem mit Resonanzen der Plasmalogene (PE(plas) Δ -1), der Sphingolipide GS/SPH (ϵ -1) und des Dolichols überlagert. Da die Dolicholkonzentration in den Tumorzentren im Vergleich zu den anderen Lipiden sehr gering ist, wird der Konzentrationsverlauf durch diese weniger beeinflusst. Die Plasmalogene und die Sphingolipide können dagegen aufgrund ihres höheren Anteils in den Lipidextrakten zu dieser Verteilung beitragen. Ihre Konzentrationsprofile unterscheiden sich leicht von dem Verlauf der Δ -1-Protonen, könnten jedoch aufsummiert einen solchen Verlauf ergeben. Trotzdem kann ein Anstieg der MUFA in den entsprechenden Extrakten nicht ausgeschlossen werden (s. Kapitel 2.4.2).

Das Konzentrationsprofil der olefinischen Protonen repräsentiert sowohl die einfach als auch die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA/PUFA) und beinhaltet zudem geringe Anteile an Cholesterol und ggf. CE. Dabei wird der Verlauf jedoch durch die PUFA dominiert. Auch hier ist eine Erhöhung in den Tumorzentren und auch in einigen Extrakten der Tumorrandozone zu beobachten. Ein Vergleich mit den Konzentrationsprofilen der Arachidonsäure und der Linolsäure lässt darauf schließen, dass beide Fettsäuren maßgeblich zu der Verteilung beitragen. Unter den PUFA stellen sie mit Docosahexaensäure die Hauptkomponenten in neuralem Gewebe dar. Während Arachidonsäure vermehrt in den malignen Tumoren auftritt, ist die Linolsäure in den hoch malignen Tumoren erhöht. Ihr Konzentrationsverlauf ähnelt dem Profil der CE und TAG. Linolsäure zählt zu den essentiellen Fettsäuren und könnte in Form von CE und TAG über die LDL-Proteine in die Zellen aufgenommen werden. Auch in anderen Untersuchungen wurden ebenfalls erhöhte Werte von Arachidon- und Linolsäure in den Tumoren detektiert^{[164],[227],[228],[241],[242]}. Diese können in Zusammenhang mit signalgebenden Prozessen stehen (u. a. Bildung von Prostaglandinen) oder durch die benötigte höhere Membranfluidität bedingt sein (vgl. Kapitel 2.2.3.2).

Damit zeigen sich auch bei den Lipiden charakteristische Lipidprofile für die drei Gewebearten. Wichtig für eine Unterscheidung sind vor allem der Anteil an GS, PC, Dolichol, CE und TAG sowie die unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzungen. Im Gegensatz zu den hydrophilen Extrakten waren die Lipidkonzentrationen der entfernten Randgebiete nicht geringer und zeigten ein einheitliches Lipidprofil, so dass eine weitere Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrandozone nicht erfolgt. Zudem unterschieden sich wie bei den hydrophilen Metaboliten die Extrakte der Randgebiete von Grad III- und Grad IV-Tumoren, allerdings nur im CE-, TAG- und

²⁰ Die Δ -1 Protonen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren liegen weiter tieffeldverschoben.

Linolsäuregehalt. Diese waren verstärkt in den Glioblastomen erhöht, so dass auch einige Randgebiete der Glioblastome diese Lipide enthielten.

2.3.4 Diskussion

Die ^1H -NMR-Spektren der Gewebeextrakte zeigen, dass die in dieser Arbeit optimierte Extraktionsmethode ein gutes Verfahren darstellt. Besonders das Vorhandensein der aktivierten Zucker UDP-Glc und UDP-Gal in einigen konzentrierten Extrakten belegt, dass die kombinierte Methode ein schonendes Verfahren ist, das trotzdem eine Fällung der Enzyme garantiert.

Es konnten über die computerbasierten Verfahren charakteristische hydrophile und lipophile Komponenten für eine Unterscheidung von Tumorzentrum, Tumorrandzone und entferntem Randgebiet bestimmt werden. Die beobachteten metabolischen Veränderungen können dabei auf zwei Faktoren zurückgeführt werden: zum einen auf den Anteil neoplastischer Zellen in den Gewebeproben. Dieser sollte vom Tumorzentrum über das Randgebiet zum entfernten Randgebiet abnehmen. Zum anderen ist auch ein durch Tumorzellen beeinflusster Stoffwechsel der gesunden Zellen denkbar, welcher evtl. räumlich begrenzt ist und nur die Tumorrandzonen betrifft. Die intratumoralen Veränderungen beruhen wahrscheinlich auf einer Kombination aus beiden Faktoren. Zudem geben die Lipidprofile des entfernten Randgebiets Hinweise auf das Vorhandensein myelinhaltigen Gewebes in diesen Biopsaten, was in Übereinstimmung mit der Lokalisation der Gliome steht. Dies könnte auch ein Grund für die geringen Konzentrationen der hydrophilen Metabolite in diesen Extrakten sein.

Die untersuchten 52 Gewebeproben sind für eine statistische Analyse noch recht gering. Vor allem die Profile der entfernten Randgebiete bedürfen einer weiteren Absicherung. Zudem wäre bei entsprechender Probenzahl auch eine differenziertere Untersuchung der Veränderungen in den Randgebieten von malignen (Grad III) und hoch malignen Tumoren (Grad IV) möglich, welche sich sowohl bei den wasserlöslichen Stoffwechselkomponenten als auch bei den Lipiden abzeichnen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Normierung auf das Gesamtintegral. Dies ist eine robuste und häufig angewandte Methode, mit der die unterschiedlichen Einwaagen der Biopsate korrigiert werden können. Sie bietet den Vorteil, dass der Wiegefehler nicht mit einkalkuliert wird. Es muss jedoch Folgendes bedacht werden: Zum einen kann es vorkommen, dass die beobachteten Veränderungen in den relativen Integralwerten bei starken Unterschieden im Metabolitenprofil nicht den Veränderungen der absoluten Konzentrationen entsprechen. Dies könnte bei den Lipiden der Fall sein, da der Gesamtlipidgehalt in myelinhaltigem Gewebe größer ist als in der grauen Substanz bzw. in Tumoren^[232]. Zum anderen werden in gering konzentrierten Extrakten, die nur die Hauptkomponenten enthalten, die vorhandenen Metaboliten stärker gewichtet. Dies ist vermutlich auch der Grund für die relevanten Adeningehalte bei der Unterscheidung der drei Gewebearten anhand der hydrophilen Metabolite.

Des Weiteren spielt die Datenvorverarbeitung bei der Mustererkennung eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurde eine signalangepasste Segmentierung ausgewählt, da diese die große Anzahl an Datenpunkten stark reduziert und dennoch einen Großteil der biologischen Information beibehält. Andere Methoden bieten evtl. eine stärkere Verminderung der Datenpunkte mit einer Reduzierung der redundanten Variablen, lassen aber keine direkten Rückschlüsse mehr auf die dahinter stehenden Metabolitenveränderungen zu. Auch die anschließend durchgeführte Zentrierung und Skalierung der Variablen nimmt Einfluss auf die Klassifikationsergebnisse. Dadurch werden die Stoffwechselprodukte gleich gewichtet, so dass gering konzentrierte Komponenten nicht durch Änderungen höher konzentrierter aber evtl. biochemisch unrelevanter Metabolite überdeckt werden. Würde bspw. nur eine Zentrierung stattfinden, so basiert die Unterscheidung auf der Varianz der Variablen^{[179],[243]}.

Die PLS-Regression und LDA-Klassifikation bestätigten und ergänzten sich bei der Bestimmung der relevanten Variablen. Sowohl bei den wasserlöslichen als auch bei den lipophilen Bestandteilen wurden gute Klassifikationsergebnisse angesichts der diffusen Klassifikationsgrenzen erreicht. Beide Methoden sind überwachte, parametrische Methoden. Die Ergebnisse wurden von den SOM-Visualisierungen bekräftigt, bei denen ein unüberwachter, nicht-parametrischer Algorithmus ähnlich dem *k-means-clustering* eingesetzt wurde^[244]. Somit werden die Ergebnisse durch den Einsatz verschiedener Verfahren abgesichert.

2.3.5 Zusammenfassung

Mittels NMR-Spektroskopie und computergestützten Verfahren lassen sich charakteristische Metabolite ermitteln, die sich für die Tumorabgrenzung bzw. die intratumorale Unterscheidung einsetzen lassen. Anhand von PLS-Regression, LDA-Klassifikation und SOM-Visualisierung konnten relevante Variablen bestimmt und verglichen werden. Zudem erlaubten die Konzentrationsverläufe in den SOM-Karten biochemische Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden pathologischen Veränderungen.

Bei den wasserlöslichen Extrakten korrelierten hohe Gehalte an Creatin, NAA, Aspartat, Glutamat und GalNAc mit dem Anteil gesunder Zellen, während erhöhte Konzentrationen an BCAAs, Alanin, Asparagin und Arginin sowie UDP-Hexose (mit Einschränkung s.o.) für die Tumorzentren charakteristisch sind. Zudem wurden tumorspezifische Unterschiede in den Gehalten von Taurin, myo- und scyllo-Inositol (erhöht in malignen Tumoren und ihren Randgebieten) sowie Hypotaurin und Glycin (erhöht in hoch malignen Tumoren und deren Randgebieten) beobachtet. Damit sollte sich das Verhältnis von myo-Inositol zu Glycin für die Abgrenzung der malignen Tumoren besonders eignen, ebenso wie das PCho-zu-GPCho-Verhältnis für die Abgrenzung der hoch malignen Tumoren.

Die Lipidprofile der entfernten Randgebiete waren durch hohe Gehalte an GS, Plasmalogenen und Cholesterol gekennzeichnet, während die Tumorzentren mehr PC und PUFAs - v. a. Arachidon- und Linolsäure - aufwiesen. Auch CE, TAG und Dolichol waren Charakteristika der Tumorzentren, wobei Dolichol vermehrt in den malignen Tumoren detektiert wurde. TAG war dagegen charakteristisch für die hoch malignen Tumoren. Die Tumorrandzonen wiesen in der Regel Konzentrationsverteilungen auf, die zwischen denen der entfernten Randgebiete und der Tumorzentren lagen. Zudem eignete sich besonders das Verhältnis von Cholesterol zu Dolichol für eine intratumorale Unterscheidung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei den wasserlöslichen Metaboliten als auch bei den Lipiden Veränderungen vom aktiven Tumorzentrum über die Tumorrandzone zum entfernten Randgebiet zu beobachten sind, anhand derer eine Unterscheidung möglich ist.

2.4 Lipidauftrennung

Die Untersuchung der lipophilen Extrakte hat gezeigt, dass sich die Tumorentitäten wie auch die verschiedenen intratumoralen Bereiche in ihren Lipidprofilen unterscheiden. Es variieren sowohl die Gehalte der verschiedenen Lipide als auch die Zusammensetzung der Fettsäurereste. Die Lipidextrakte stellen komplexe Gemische der verschiedenen Lipidklassen dar, die wiederum aus einer Vielzahl einzelner Spezies bestehen (mit Ausnahme von Cholesterol). Diese unterscheiden sich lediglich in Kettenlänge und Sättigung ihrer gebundenen Fettsäuren. Damit bedarf es für eine detaillierte Analyse der Lipide einer chromatographischen Trennmethode, so dass ein weiterer Aspekt dieser Arbeit in der Auftrennung von Lipiden liegt.

Hierfür werden chromatographische Methoden wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)^{[245],[246]}, Dünnschichtchromatographie (TLC)^[247] und Festphasenextraktion (SPE)^{[248]-[250]} eingesetzt, um die Lipidklassen zu trennen. Mit der Umkehrphasen-HPLC können zudem Spezies innerhalb einer Klasse aufgetrennt werden^{[251],[252]}.

Aufgrund der Schnelligkeit, des geringen Lösungsmittelverbrauchs und der möglichen Automatisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit eine SPE-Methode weiterentwickelt und eingesetzt. Diese eignet sich zudem gut für die Kombination mit der NMR-Spektroskopie. Ferner sind anschließende Auftrennungen oder Analysen aufgrund des nicht-destruktiven Messverfahrens möglich.

Im Folgenden wird zunächst die optimierte Festphasenextraktion der Lipidklassentrennung vorgestellt und anschließend deren Ergebnisse bei der Auftrennung von Hirntumorextrakten. Dabei ging es vorrangig darum, die Fettsäureverteilung in den Lipidklassen NMR-spektroskopisch zu analysieren und zudem die bei der Mustererkennung beobachtete Korrelation von Linolsäure zu CE und TAG zu überprüfen. Im Laufe der Arbeit wurden bereits vor dem Abschluss der Methodenoptimierung acht Lipidextrakte aufgetrennt (vgl 2.2.2). Diese wurden in die Auswertung mit einbezogen (mit einer Ausnahme aufgrund der Tumorentität), um eine höhere Probenanzahl zu erlangen. Insgesamt wurden somit neun Lipidextrakte der Tumorzentren, vier der Tumorrandozonen und zwei der entfernten Randgebiete untersucht.

2.4.1 Optimierung und Überprüfung der Festphasenextraktion

Lipidextrakte verschiedener Gewebearten unterscheiden sich häufig in ihren Lipidprofilen, so dass SPE-Methoden in der Regel nicht uneingeschränkt übertragbar sind. Oft bedarf es einer Anpassung an die vorliegende Lipidzusammensetzung des Probenmaterials. Entscheidend sind zudem die verwendeten Kartuschen und Lösungsmittel sowie ihr Feuchtigkeitsgehalt^[253]. Ausgangspunkt für die Auftrennung der neuronalen Lipidextrakte war eine von Kaluzny et al. publizierte Methode, bei der die Lipidklassen in zwei Stufen über Aminopropyl-Phasen nach ihrer Polarität getrennt

werden^[248]. Diese wurde ausgewählt, da sie eine Auftrennung der in den Extrakten auftretenden Lipidklassen erlaubt (siehe Abbildung 47). In mehreren Schritten erfolgte eine Anpassung und Optimierung der SPE anhand von Lipidstandards und Lipidextrakten (Hirn und Leber des Schweins), von denen im Folgenden nur die Endresultate vorgestellt werden.

Bei der Methode nach Kaluzny werden zunächst die neutralen Lipide von den freien Fettsäuren und den polaren Lipiden, d. h. den Glycerophospho- und Sphingolipiden, getrennt. Diese erste Stufe wurde durch zwei Modifizierungen angepasst bzw. ergänzt. Ein Teil der Sphingolipide eluierte bereits mit den neutralen Lipiden im ersten Elutionsschritt. Durch die Erhöhung des Chloroformanteils auf ein Verhältnis von CHCl_3 /Isopropanol (3:1) in Eluent A konnte dies jedoch auf 5% der gesamten Sphingolipide gesenkt werden, ohne die Elution der restlichen Lipide zu beeinflussen. Zudem war die Einführung eines vierten Elutionsschritts notwendig, da die sauren Phospholipide (Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS) und – inositol (PI)) bei der Elution mit Methanol retardiert bleiben^[249]. Am besten werden diese aus dem Sorbens mit einem Laufmittelgemisch aus CHCl_3 /Methanol (2:1) mit einem Zusatz an Natriumacetat (NaAc) gelöst (Schwalbe-Herrmann, unveröff. Ergebnisse).

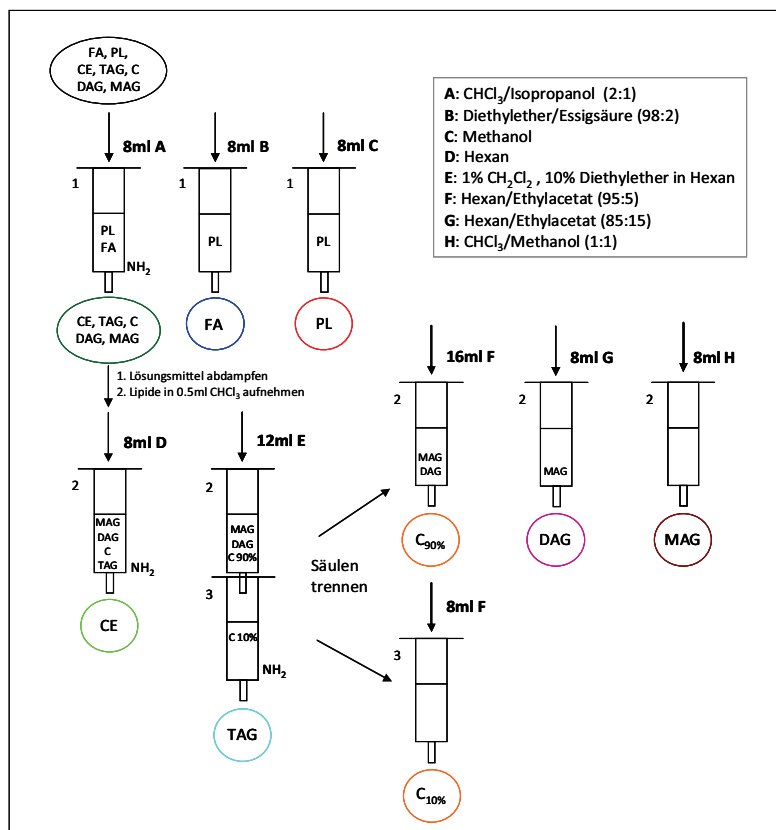


Abbildung 47: Festphasenextraktion nach Kaluzny et al.^[248]. Um die vorzeitige Elution des Cholesterols zu vermeiden, werden bei der Auftrennung der neutralen Lipide zwei Säulen gekoppelt. Die Buchstabenbezeichnung der Eluenten entspricht zudem der Elutionsreihenfolge.

Die zweite Stufe nach Kaluzny et al., d. h. die Auftrennung der neutralen Lipidklassen, konnte nicht reproduziert werden, da ein Teil der Lipide in nachfolgende Fraktionen verschleppt wurde. Zudem ist der Einsatz von zwei Kartuschen umständlich. Deshalb wurde die Auftrennung der neutralen Lipidklassen nochmals überarbeitet. Auf Basis der Aminopropylkartuschen konnten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden (keine Trennung von CE und TAG, Verschleppung von DAG), so dass weitere stationäre Phasen (Kieselgel, Diol und Cyanopropyl) untersucht wurden. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit unmodifiziertem Kieselgel erreicht. Die optimierte Methode (inklusive der ersten Stufe) ist in Abbildung 48 gezeigt. Wie bei der ursprünglichen Auftrennung werden die neutralen Lipide nach aufsteigender Polarität fraktionierend eluiert. Durch die Verwendung von Hexan-Diethylether-Gemischen (98:2 bzw. 90:10) konnten CE und TAG voneinander getrennt werden ohne eine vorzeitige Elution von Cholesterol^[254]. Letzteres wurde im anschließenden Schritt ebenfalls über ein Hexan-Ethylacetat-Gemisch erhalten. Durch Erhöhung des Ethylacetatanteils im Laufmittel von 5% auf 9% konnte zudem das Elutionsvolumen von 24 ml auf 10 ml vermindert werden. Lediglich knapp 9% der DAG eluieren dadurch bereits in der Cholesterolfraction.

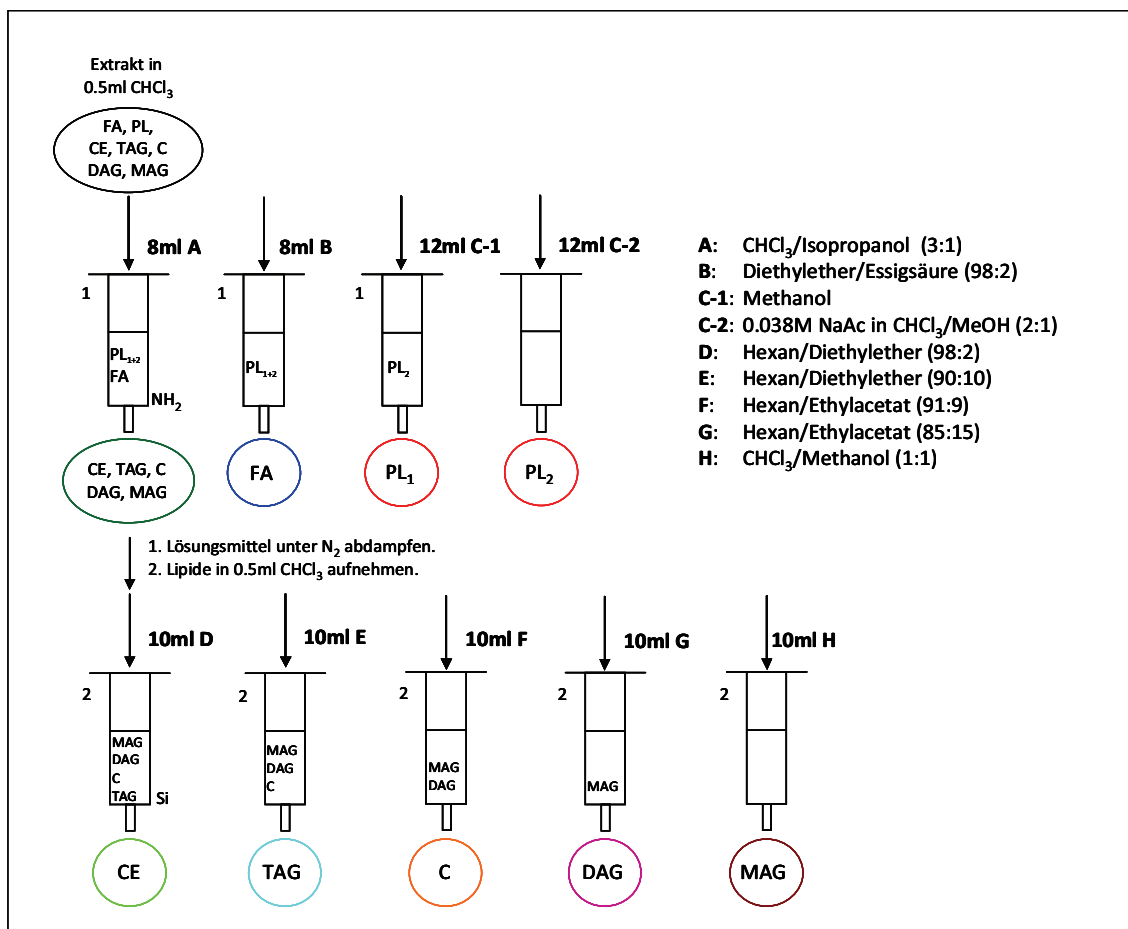


Abbildung 48: Optimierte SPE-Methode zur Auftrennung der Lipidklassen cerebraler Extrakte.

Da Cholesterol in den für eine Quantifizierung entscheidenden Signalen (C18 und C3) nicht mit den DAG-Resonanzen überlagert und im Gegenzug die Bestimmung des DAG nicht beeinträchtigt, ist dies vertretbar. Die Eluenten G und H wurden auf die Kieselgelkartusche übertragen. Das Volumen wurde dabei von 8 ml auf 10 ml erhöht, um eine vollständige Elution zu erreichen.

Neben der NMR-spektroskopischen Überprüfung der Auftrennung erfolgte zudem eine ESI-massenspektrometrische Untersuchung der SPE-Fractionen mittels direkter Injektion. Diese bestätigte die Lipidklassentrennung (siehe Abbildung 49). Die Fraktion der sauren Lipide enthielt PA, PI und PS, wobei die PA-Spezies überwiegend durch die Kopfgruppenabspaltung von PS gebildet werden. Dieses fragmentiert bereits bei hoher *Compound Stability* (CS) unter Abspaltung des Serinrests (Neutralteilverlust von 87 u im negativen ESI-Spektrum). Neutrale Phospholipide wurden in dieser Fraktion nicht detektiert. Auch die saubere Abtrennung von CE und TAG wurde bestätigt. Das Fragmentation A der CE-Fraktion entsteht dabei durch *Mc-Lafferty-Abspaltung* der Fettsäuren. Zudem zeigt das ESI-Spektrum der TAG deutlich deren komplexe Zusammensetzung, weshalb hier auf eine Angabe der Spezies verzichtet wurde. Die Molekülionen bei m/z 158, m/z 214, m/z 269 und m/z 663 in der CE- bzw. TAG-Fraktion sind Kontaminanten, die vermutlich aus der Polypropylenkartusche während der Auftrennung herausgelöst werden (durch MS^2 abgesichert).

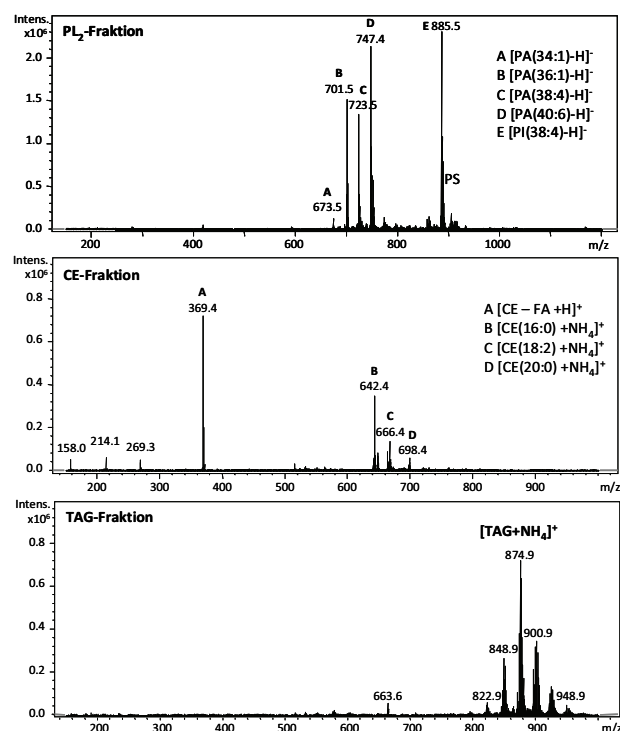


Abbildung 49: ESI-MS-Spektren ausgewählter SPE-Fractionen (gemischtes Extrakt aus Hirn und Leber des Schweins). Zur besseren Übersicht sind nur exemplarisch einige Hauptkomponenten angegeben. Die PL₂-Fraktion wurde im negativen Ionenmodus analysiert (aus MeOH, CS 80), CE und TAG dagegen im positiven Ionenmodus gemessen (aus MeOH unter Zugabe von NH₄⁺ Acetat, CS 50).

Die Reproduzierbarkeit und Wiederfindung der Analyten sind zwei weitere entscheidende Faktoren. Sie wurden anhand von Lipidstandardgemischen überprüft (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Wiederfindungsraten der verschiedenen Lipidklassen für die optimierte Methode.

Lipidklasse	Wiederfindung
Freie Fettsäuren	103% (n = 3)
Polare Lipide (PC)	91% (n = 3)
CE	103% (n = 2)
TAG	100% (n = 2)
C	99% (n = 2)
DAG	58% (n = 2)
MAG	86% (n = 2)

Die optimierte SPE-Methode erzielte reproduzierbare Ergebnisse mit guten Wiederfindungen. Lediglich für die sauren Phospholipide wurde diese nicht überprüft (s. u.). Wiederfindungsraten von mehr als 100% werden durch den Fehler der Quantifizierung hervorgerufen. In dieser Arbeit wurde ein externer TSP-Standard verwendet, der eine Abweichung von 6% aufweist. Somit können bei sehr guten Ausbeuten Wiederfindungsraten von mehr als 100% auftreten. Lediglich die vergleichsweise polaren DAG und MAG werden nicht quantitativ eluiert. Sie tragen eine bzw. zwei freie Hydroxylgruppen im Glycerolgerüst, weshalb sie stärker retardiert werden. Zudem ist ihre molekulare Struktur kleiner bzw. flexibler als das starre Cholesterolgrundgerüst, welches trotz seiner freien Hydroxylgruppe eine gute Wiederfindung aufweist. Durch eine leichte Ansäuerung der Eluenten G und H könnte die Wiederfindung verbessert werden, da die Silanolgruppen im Kieselgel dann vollständig protoniert werden. Auf diese Weise werden ionische Wechselwirkungen durch deprotonierte Gruppen vermieden und die Lipide nur durch die schwächeren van der Waals-Kräfte (Wasserstoffbrückenbindungen) retardiert.

Es wurde eine schnelle, reproduzierbare und kostengünstige Methode zur Auftrennung der Lipidklassen entwickelt, die eine Kombination mit der NMR-Spektroskopie erlaubt. Lediglich bei den sauren Phospholipiden bestehen Schwierigkeiten mit der ^1H -NMR-spektroskopischen Analyse, da die entscheidenden Kopfgruppensignale in den ^1H -NMR-Spektren verbreiterte Signale mit geringen Auflösungen aufweisen, so dass eine Zuordnung und Quantifizierung erschwert ist. Im lipophilen Lösungsmittelgemisch ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 2:1) scheinen sich inverse Micellen der amphipatischen Lipide auszubilden, so dass die Kopfgruppen leicht immobilisiert sind. Damit werden die anisotropen Wechselwirkungen nicht mehr gemittelt, so dass es zu einer Verbreiterung der Signale kommt. Der Salzgehalt des Eluenten C-2 könnte zudem die Micellenbildung begünstigen. Durch chemische Zusätze oder die Analyse mittels ^{31}P -NMR könnte dieses Problem umgangen werden.

2.4.2 Ergebnisse

Die optimierte SPE-Methode konnte erfolgreich auf die Lipidextrakte der Hirntumoren angewandt werden, so dass eine Analyse der Fettsäureverteilung der verschiedenen Klassen möglich war.

Die Fraktionen der freien Fettsäuren enthielten in allen drei untersuchten Gewebearten nur wenig freie Fettsäuren und ließen keinen Trend erkennen. Somit scheint ein pathologischer Hintergrund unwahrscheinlich, zumal die Konzentration freier Fettsäuren im Gewebe sehr gering ist^[76].

Die Fraktionen der polaren Lipide von Tumorzentrum, Randzone und entf. Randgebiet unterscheiden sich dagegen. Die verschiedenen Fettsäureverhältnisse in den PL₁-Fraktionen sind in Abbildung 50 dargestellt. Werden die entsprechenden Signale in Relation zueinander gesetzt, können das Ausmaß der Sättigung/Unsättigung oder Anteile bestimmter Spezies (bspw. PUFAs) ermittelt werden. Es zeigt sich, dass die polaren Lipide der Tumorzentren im Vergleich zu den Randzonen und entfernten Randgebieten einen höheren Anteil an PUFA aufweisen (PUFA(Δ CH₂ Δ)/ FA α). Wie in den Konzentrationsverläufen der SOM-Karten tragen auch bei den polaren Lipiden Linolsäure (18:2/ PUFA) und Arachidonsäure (20:4/ PUFA) dazu bei. Erstere weist in den zwei Extrakten der entfernten Randgebiete sehr unterschiedliche Anteile auf (18:2/PUFA: 0.02 vs 0.10), so dass keine eindeutige Aussage über den Linolsäureanteil in den entfernten Randgebieten getroffen werden kann. Die verminderten Anteile in den Tumorrandzonen könnten jedoch darauf hinweisen, dass es sich bei dem hohen Wert um einen Ausreißer handelt. Ebenso sind die ω -3-Fettsäuren (F ω (n-3)/ F ω) in den Tumorzentren erhöht, zu denen hauptsächlich die Docosahexaensäure (DHA, 22:6(n-3)) beiträgt. Auch die nicht aufgetrennten Lipidextrakte der Tumorzentren wiesen im Mittel erhöhte DHA-Werte auf.

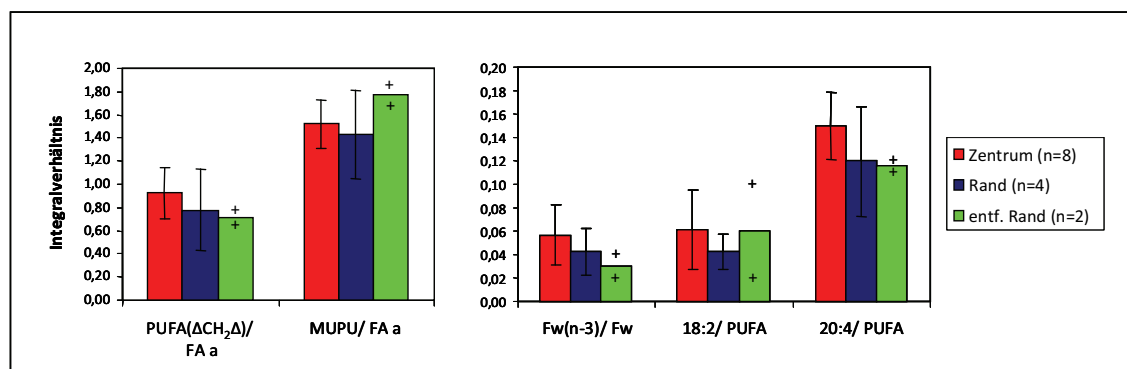


Abbildung 50: Fettsäureverhältnisse der polaren Lipide (PL₁-Fraktion) in den Tumorzentren (rot), Tumorrandzonen (blau) und entf. Randgebieten (grün). Die Werte der Integralverhältnisse der entfernten Randgebiete sind eingezeichnet (+).

Für eine intratumorale Unterscheidung war DHA jedoch nicht relevant, während andere Studien dagegen von verminderten DHA-Gehalten in Gliomen verglichen zu gesundem Gewebe berichten^{[227],[242]}. Ein Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte darin liegen, dass DHA in der weißen Substanz geringer konzentriert ist als in der grauen Substanz^[255]. Aufgrund der biologischen Funktion der DHA wäre jedoch eine Abnahme zum Tumorzentrum erwartet worden, da DHA die biosynthetische Vorstufe der Docosanoide ist, die an anti-inflammatorischen und immunologischen Prozessen beteiligt sind^[256]. Zudem ist freigesetzte DHA einen Gegenspieler zur Arachidonsäure, da es mit dieser um Bindungsstellen an der Cyclooxygenase-2 konkurriert, so dass weniger pro-inflammatorische Eicosanoide gebildet werden^[257]. Ferner vermindert DHA wie auch die anderen ω -3-Fettsäuren das Krebsrisiko in Brust, Prostata, Darm und Niere^[258]. Eventuell ist DHA dennoch in den Tumoren aufgrund ihres starken Einflusses auf die Membranfluidität erhöht. Diese Beobachtung sollte jedoch durch die Analyse weiterer Biopsate abgesichert werden.

Werden die olefinischen Protonen der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA, olefinische Protonen) auf die α -Methylenprotonen bezogen, so ist ein Anstieg im entf. Randgebiet zu beobachten. Dieser kann nicht allein auf den hohen Linolsäuregehalt des einen Extrakts zurückgeführt werden, da beide Extrakte ähnliche Werte aufweisen. Damit müssen die Lipidextrakte der entfernten Randgebiete einen erhöhten MUFA-Anteil aufweisen. Auch die Konzentrationsverteilungen der Δ -1-Protonen in den SOM-Karten wiesen darauf hin (vgl. Abbildung 46). Dies konnte jedoch aufgrund von Signalüberlagerungen nicht eindeutig aufgeklärt werden. Zum einen können die MUFA zugunsten der PUFA in den Tumoren erniedrigt sein, zum anderen kann der Anstieg in Zusammenhang mit den höheren Gehalten an GS in den entfernten Randgebieten stehen. Die (Glyko-)Sphingolipide tragen vermehrt gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren (darunter auch α -Hydroxy Fettsäuren)^[259] und bilden zusammen mit Cholesterol so genannte „lipid rafts“. Dies sind geordnete Lipidstrukturen innerhalb der Plasmamembran, in denen Proteine und Rezeptoren verankert sind^[231]. Sie sind umgeben von „ungeordneten“ Lipidansammlungen, die hauptsächlich aus Glycerophospholipiden mit geringerem Sättigungsgrad bestehen. Die stärkere räumliche Wechselwirkung von Cholesterol und Sphingolipiden spielt auch bei der Bildung des Myelins eine wichtige Rolle.

Neben dem Fettsäureprofil der polaren Lipide ist zudem die Fettsäureverteilung der neutralen Lipide entscheidend. Da diese vorwiegend in den Tumorzentren auftreten, ist ein intratumoraler Vergleich nicht sinnvoll. Deshalb wurde die Fettsäureverteilung der verschiedenen Lipidklassen innerhalb der Tumorzentren analysiert. Da nur zwei Extrakte, die nach der optimierten SPE aufgetrennt wurden, TAG enthielten, wurden für die Auswertung CE und TAG zusammengefasst, um auch die anderen Fraktionen der älteren Auftrennung mit hinzunehmen zu können, in denen die beiden Lipidklassen nicht getrennt werden konnten. Der Vergleich zwischen den polaren und neutralen Lipiden zeigt, dass die beobachtete Erhöhung der PUFA in den Lipidextrakten der Tumorzentren verstärkt auf die polaren Membranlipide zurückzuführen ist (PUFA/FA α) (Abbildung 51).

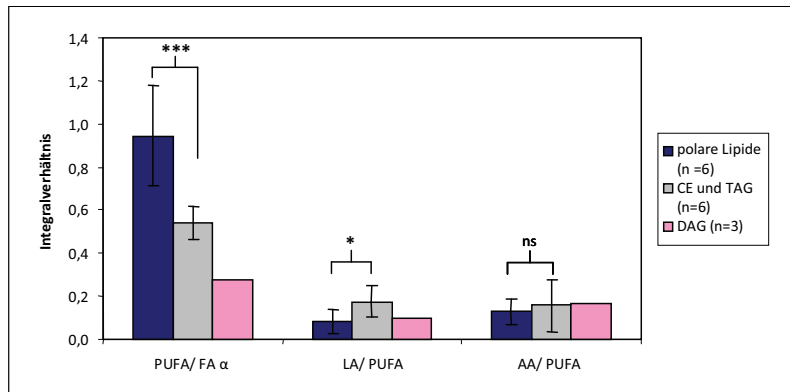


Abbildung 51: Fettsäureverteilung der polaren und neutralen Lipide der Tumorzentren. Signifikante Unterschiede ($p < 0.001$ bzw. * $p < 0.01$) liegen im Sättigungsgrad (PUFA/FA α) und dem Anteil der Linolsäure an den PUFAs vor (LA/PUFA).**

Zudem geht aus der Abbildung hervor, dass CE und TAG innerhalb der PUFAs einen signifikant größeren Anteil an Linolsäure im Vergleich zu den polaren Lipiden aufweisen (LA/PUFA). Dies bestätigt die in den Konzentrationsprofilen der SOM-Karten beobachtete Korrelation zwischen Linolsäure, CE und TAG, zumal die DAG auch verminderte Werte aufweisen. Da in den Zellen ausgehend von der Linolsäure weitere relevante PUFAs synthetisiert werden, ist ihr Anteil in den polaren Lipiden geringer. Der Anteil der Arachidonsäure an den PUFAs (AA/PUFA) wies dagegen keine signifikanten Unterschiede in den Lipidklassen auf.

Die MAG-Fractionen enthielten teilweise mit den neutralen Lipiden eluierte Sphingolipide, welche wie in der Literatur beschrieben (s. o.) nur geringe Anteile an einfach ungesättigten Fettsäuren aufwiesen (vgl. Abbildung 24).

2.4.3 Diskussion

Durch die Auftrennung der Lipidextrakte konnte gezeigt werden, dass der höhere PUFA-Anteil in den Tumorzentren auf die polaren Lipide zurückzuführen ist. Dies bestätigt die vermuteten abnormen signalgebenden Prozesse bzw. die Änderungen der Membranfluidität und –flexibilität. Zudem beeinflussen die PUFAs die selektive Membranpermeabilität^[260].

Auch die Korrelation der Linolsäure zu CE und TAG wurde durch die SPE bestätigt. Dies sollte jedoch über weitere Auftrennungen abgesichert werden, da die Gehalte essentieller Fettsäuren und ihrer biologischen Nachfolgeprodukte wesentlich durch die Ernährung beeinflusst werden.

Für medizinische und biochemische Fragestellungen ist die genaue Kenntnis der Lipidzusammensetzung relevant, um detaillierte Informationen über die Veränderungen im Lipidstoffwechsel zu erhalten. Es bedarf einer vollständigen quantitativen und qualitativen Analyse, die Aufschluss über Vorhandensein und Menge jeder einzelnen Komponente gibt. Dabei ist zudem nicht nur die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Spezies relevant, sondern auch die Position am Glycerolgrundgerüst. Beispielsweise ist bekannt, dass PUFAs bei den Phospholipiden bevorzugt in sn2-Position des Grundgerüsts verestert sind, während an der sn1-Position die weniger ungesättigte Fettsäure gebunden ist. Durch diese Information lassen sich weitere Rückschlüsse auf die dahinter stehenden Enzyme und Prozesse ziehen. Die optimierte SPE zur Auftrennung der Lipidklassen ist dabei ein Ansatz zur Lösung dieser Aufgabenstellung. Die erhaltenen Fraktionen können neben der NMR-spektroskopischen Analyse beispielsweise auch über die HPLC-MS in ihre Einzelkomponenten bzw. Unterklassen getrennt und über den Massenanalysator identifiziert werden.

3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden maligne Hirntumoren (Gliome, WHO-Grad III und IV) unter besonderer Berücksichtigung der Tumorabgrenzung NMR-spektroskopisch charakterisiert. Es wurden verschiedene intratumorale Bereiche – aktives Tumorzentrum, Tumorrandzone und entferntes Randgebiet – anhand von hydrophilen und lipophilen Gewebeextrakten untersucht. Deshalb wurde zu Beginn dieser Arbeit eine Dualphasentechnik zur simultanen Extraktion der hydrophilen und lipophilen Bestandteile optimiert. Es wurde eine effiziente und reproduzierbare Methode entwickelt, die die Analyten unter schonenden Bedingungen quantitativ isoliert und eine vollständige Enzyminaktivierung garantiert.

Neben der regionalen Tumorabgrenzung wurden die metabolischen Charakteristika der verschiedenen Tumorentitäten analysiert und untereinander bzw. zum entfernten Randgebiet verglichen. Die verschiedenen Tumoren wiesen dabei unterschiedliche Metabolitenprofile auf, welche typische Veränderungen neoplastischer Zellen reflektierten. Im Vergleich zum entfernten Randgebiet zeigten sich in der Regel ähnliche metabolische Veränderungen, so dass maligne (WHO III) und hoch maligne Gliome (WHO IV) für eine intratumorale Unterscheidung zusammengefasst wurden.

Für die Identifizierung charakteristischer Metabolite bzw. Metabolitenkombinationen der drei Tumorbereiche wurden verschiedene Mustererkennungsverfahren eingesetzt. Die für eine Unterscheidung relevanten Stoffwechselkomponenten wurden mit einer PLS-Regression bestimmt und die Klassifikationsgüte der einzelnen Metabolite bzw. der Metabolitenkombinationen wurde anhand einer LDA-Klassifikation ermittelt. Die Konzentrationsprofile der relevanten Komponenten wurden mittels Selbstorganisierender Karten (SOM) dargestellt.

Bei der intratumoralen Unterscheidung der Gliome erwiesen sich von den hydrophilen Metaboliten besonders erhöhte Gehalte an NAA, Creatin, Aspartat und GalNAc als charakteristisch für das entfernte Randgebiet und damit für den Anteil gesunder Zellen in den Biopsaten. Im Gegensatz dazu waren die BCAAs, Asparagin, Arginin und Alanin im Tumorzentrum erhöht. In der Tumorrandzone lagen die Gehalte der Metabolite erwartungsgemäß zwischen denen des Tumorzentrums und des entfernten Randgebiets, meist aber näher am Tumorzentrum. Zudem wurden tumorspezifische Veränderungen beobachtet: myo- und scyllo-Inositol sowie Taurin waren speziell in den malignen Tumoren (WHO III) und ihren Randgebieten erhöht, während sich das Verhältnis von PCho zu GPCho ebenso wie Glycin und Hypotaurin besonders für die Abgrenzung hoch maligner Tumoren (WHO IV) und damit als Malignitätsmarker eigneten.

Die veränderten Metabolitenprofile reflektieren die Verdrängung neuronaler Strukturen (Abnahme von NAA) und den verschlechterten Energiestatus bzw. den veränderten Energiestoffwechsel (vermehrte Glykolyse/ Glutaminolyse und beeinträchtigter Citratzyklus) in den Tumorzentren (Abnahme von Creatin und Aspartat, Zunahme von

BCAAs, Alanin, Arginin und Asparagin). Ebenso geben sie Hinweise auf einen veränderten Glykokonjugatstoffwechsel (Abnahme von GalNAc).

Auch in den Lipidprofilen wurden charakteristische Unterschiede zwischen den drei Tumorregionen beobachtet: Das entfernte Randgebiet war vor allem durch größere Gehalte an GS, Plasmalogenen und Cholesterol gekennzeichnet. Das Tumorzentrum wies dagegen vermehrt PC auf und enthielt höhere Anteile an PUFAs, speziell Linol- und Arachidonsäure. CE, TAG und Dolichol(-phosphat) waren ebenfalls metabolische Marker aktiven Tumorgewebes. Letztere zeigten zudem tumorspezifische Verteilungen. Während Dolichol(-phosphat) vermehrt in den Tumorzentren der malignen Tumoren auftrat, war TAG für die hoch malignen Tumoren charakteristisch. Wie bei den hydrophilen Metaboliten lag auch hier das Lipidprofil der Tumorrandzone zwischen denen des Tumorzentrums und des entfernten Randgebiets. Zudem eigneten sich besonders die Verhältnisse von GS zu SPH sowie Cholesterol zu Dolichol für eine intratumorale Unterscheidung.

Des Weiteren wurde im Rahmen der Arbeit eine bestehende Festphasenextraktion zur Auftrennung der Lipidklassen an die neuralen Lipidextrakte angepasst. Durch die Verwendung einer Aminopropyl- und einer unmodifizierten Kieselgelphase konnte eine Trennung in freie Fettsäuren, neutrale und saure Phospholipide sowie CE, TAG, C, DAG und MAG erreicht werden. Durch die Auftrennung von insgesamt fünfzehn Lipidextrakten wurde gezeigt, dass die Erhöhung der PUFAs in den Tumorzentren auf die polaren Lipide zurückzuführen ist, während das entfernte Randgebiet vermehrt MUFAs aufweist. Zudem konnte eine in den SOM-Karten beobachtete Korrelation von Linolsäure zu CE und TAG bestätigt werden.

Die erhöhten Gehalte an Cholesterol, GS, Plasmalogenen und der vermehrte Anteil an MUFAs in den Extrakten der entfernten Randgebiete weisen auf das Vorhandensein myelinhaltiger Strukturen in diesen Gewebeproben hin. Die Veränderungen der Lipidprofile der Tumorzentren stehen mit einem gesteigerten Umsatz an Membranlipiden (erhöhte Gehalte an PC) und einem erhöhten Bedarf an Membranfluidität/ - permeabilität in Zusammenhang (hoher PUFA-Anteil). Zudem geben die erhöhten Gehalte an Dolichol(-phosphat) - ebenso wie die Abnahme von GalNAc - Hinweise auf einen veränderten Glykokonjugatstoffwechsel. CE und TAG stellen Malignitätsmarker dar, die auf eine vermehrte angiogenetische Proliferation sowie auf das Vorhandensein cytoplasmatischer Lipidtröpfchen hindeuten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei den hydrophilen Komponenten als auch bei den Lipiden markante Änderungen im Metaboliten- bzw. Lipidprofil vorliegen, die eine intratumorale Unterscheidung ermöglichen. Diese basieren auf dem Anteil neoplastischer Zellen in den Gewebeproben, welcher vom Tumorzentrum über die Randzone zum entfernten Randgebiet abnimmt, und vermutlich auf einem durch Tumorzellen beeinflussten Stoffwechsel der gesunden Zellen.

4 Ausblick

Durch die Kombination der NMR-spektroskopischen Analyse mit verschiedenen Verfahren der Mustererkennung wurden charakteristische Metabolite bzw. Metabolitenprofile für eine intratumorale Unterscheidung bestimmt. Die Ergebnisse sollten durch die Untersuchung weiterer Biopsate statistisch abgesichert werden. Dies gilt vor allem für die Gewebeproben des entfernten Randgebiets. Zudem würden größere Probenanzahlen präzisere Vergleiche der intratumoralen Veränderungen bei malignen und hoch malignen Tumoren ermöglichen.

Ferner wäre eine Überprüfung der Ergebnisse über die Analyse intakter Biopsate anhand der MAS-Technik sinnvoll, da die Spektren aufgrund der intakten Gewebestruktur besser mit den Ergebnissen der *in-vivo* Spektroskopie korrelieren. Zudem reflektieren sie vorzugsweise mobile und damit stoffwechselaktive Metabolite. Des Weiteren könnten nach der NMR-spektroskopischen Gewebeanalyse weitere histologische Untersuchungen folgen, so dass Korrelationen histologischer Merkmale mit NMR-Spektren bestimmt werden könnten. Auf diese Weise wäre es auch möglich, den Anteil neoplastischer Zellen in den untersuchten Gewebeproben zu analysieren und mit den Metabolitenprofilen in Zusammenhang zu setzen.

Im Hinblick auf die *in-vivo*-MRS sind vor allem die wasserlöslichen Metabolite relevant, da die Lipide größtenteils in den Zellmembranen immobilisiert und damit nicht sichtbar sind (mit Ausnahme der cytoplasmatischen Lipidtröpfchen). Für die Tumorabgrenzung *in vivo* scheinen besonders Creatin, NAA, Alanin, Glycin und die Inositol-Isomere vielversprechend zu sein, zumal inzwischen durch höhere Feldstärken und auf die Metabolite abgestimmte Pulssequenzen bessere Auflösungen und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erreicht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Auswahl einer geeigneten Extraktionstechnik

5.1.1 Geräte

Analysenwaage:	<i>AE 200</i>	Mettler, Giessen
Lyophilisator:	Beta I	Christ, Osterode
pH-Meter:	digital pH-Meter	Knick, Berlin
Potter:	<i>Potter S</i>	B.Braun, Melsungen
Vortex Schüttler:	<i>Reax top</i>	Heidolph, Schwabach
Waage:	<i>L310</i>	Satorius, Göttingen
Zentrifuge:	<i>Univeral 16R</i>	Hettich, Tuttlingen

5.1.2 Chemikalien

Bidestilliertes Wasser wurde der hauseigenen Anlage entnommen.

Chloroform	<i>AnalaR Normapur</i>	VWR, Darmstadt
Methanol	<i>LC-MS Chromasolv</i>	Riedel de Haën, Seelze
Perchlorsäure	<i>puriss, p.a.</i>	Sigma Aldrich, München

5.1.3 Durchführung

Alle Extraktionen wurden mit gekühlten Lösungsmitteln und Geräten durchgeführt. Als Probenmaterial diente neurales Gewebe vom Schwein, welches von einer Schlachtereier bezogen und direkt nach Erhalt eingefroren wurde. Die jeweils benötigte Menge wurde in gefrorenem Zustand abgewogen und unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Anschließend erfolgte die Portionierung des pulverisierten Gewebes, welches bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert wurde. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels der ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert und mit einem externen TSP-Standard (Trimethylsilylpropionat (Na-Salz)) quantifiziert. Die Integrationsbereiche für die Quantifizierung sind dem Anhang zu entnehmen.

5.1.3.1 PCA-Extraktion mit anschließender Lipidisolierung nach Henke (leicht modifiziert)

Die Extraktion des Gewebes erfolgte in einem Potter mit 2 ml 5%iger PCA (20 Hübe bei 800 Umdrehungen pro Minute (U/min)). Das Homogenat wurde daraufhin in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Potter dreimal mit 500 µL bidest. Wasser ausgewaschen. Die Phasen wurden vereinigt und für 15 Minuten bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzuschneiden. Der Überstand mit den wasserlöslichen Metaboliten wurde abgenommen und mit 6M bzw. 0,6M KOH-Lösung neutralisiert (pH 7.00). Anschließend wurde ausgefallenes Kaliumperchlorat abzentrifugiert (10 Min, 4°C, 4000 U/min) und die wässrige Phase über Nacht lyophilisiert. Für die NMR-spektroskopische Analyse wurde das Lyophilisat in 600 µL D₂O gelöst und nochmals mit DCI und KOD auf pH 7.00 eingestellt.

Das aus dem ersten Schritt verbliebene Pellet wurde mit je 2 ml Methanol und Chloroform auf dem Schüttler 2 Minuten extrahiert. Auch hier wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (10 Min, 4°C, 4000 U/min) und der Überstand abgenommen und im Stickstoffstrom eingedampft. Anschließend wurden die Lipide in 500 µL $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (2:1) aufgenommen.

5.1.3.2 Dualphasenextraktion nach Beckonert

Bei der Dualphasenextraktion (auch CMB-Methode genannt) erfolgte die Extraktion mit Methanol, Chloroform und bidestilliertem Wasser (1:1:1). Das Vorgehen entsprach dem ersten Extraktionsvorgang der kombinierten Methode, deren Durchführung unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben ist. Lediglich die Lösung der Lipide erfolgte wie bei dem Verfahren nach Henke in 500 µL $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (2:1).

5.1.3.3 Vergleich von Dualphasentechnik und PCA-Extraktion mit anschließender Lipidisolierung

Für die Untersuchung der in dieser Arbeitsgruppe etablierten Methoden nach Henke bzw. Beckonert wurden jeweils 1000 mg Gewebe zur Extraktion eingesetzt. Pro Verfahren erfolgten zwei Wiederholungen.

5.1.3.4 Untersuchung zur quantitativen Isolierung

Für die Überprüfung auf eine vollständige Extraktion wurden aus einer Gewebeprobe je drei hydrophile und drei lipophile Extrakte erstellt und der Gehalt in den einzelnen Extrakten bestimmt (siehe Abbildung 52). Dafür wurde zunächst eine Dualphasenextraktion durchgeführt, gefolgt von zwei weiteren Lipidextraktionen mit je 1 ml an Chloroform und Methanol (jeweils 2 Minuten auf dem Schüttler) sowie zwei weiteren Extraktionen mit je 1 ml bidest. Wasser (ebenfalls je 2 Minuten durchmischt). Die unlöslichen Bestandteile wurden nach jeder Extraktion durch Zentrifugieren entfernt (10 Minuten, 4°C, 4000 U/min). Es wurden vier Proben á 240 mg, 280 mg, 450 mg und 550 mg extrahiert.

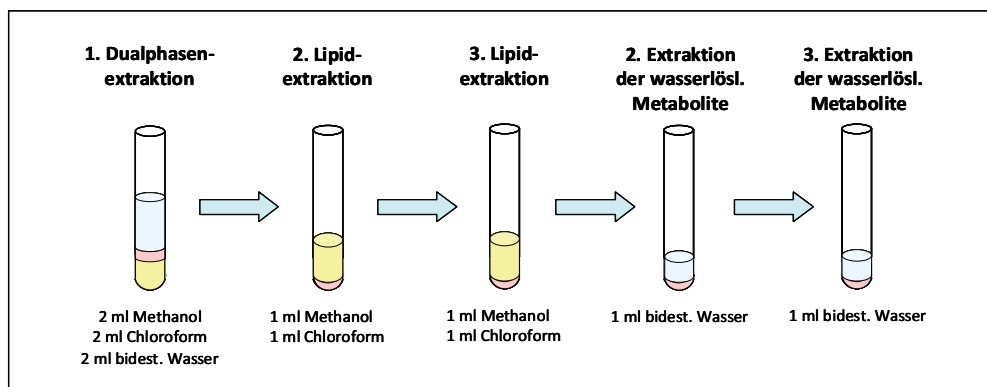


Abbildung 52: Ablauf zur Untersuchung auf eine quantitative Extraktion des Gewebes.

5.1.3.5 Überprüfung der weiterentwickelten Dualphasenextraktion

Die weiterentwickelte Dualphasenextraktion ist unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben. Zum Vergleich wurden die Verfahren nach Henke und Beckonert eingesetzt (siehe 5.1.3.1 bzw. 5.1.3.2). Diesen wurden zwei bzw. drei weitere Extraktionsschritte angefügt, um einen Vergleich zu ermöglichen. Zudem wurden Lösungsmittelvolumina sowie Extraktions- und Zentrifugationszeiten bei den drei Prozeduren konstant gehalten. Das Vorgehen ist in Abbildung 53 dargestellt. Der erste Extraktionsvorgang erfolgte im Potter (3 x 20 Hübe, 800 U/min). Anschließend wurde 30 Minuten bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Bei den nachfolgenden Extraktionsschritten 2 bis 4 wurden die Proben jeweils 2 Minuten auf einem Schüttler durchmischt. Zur Abscheidung der nichtlöslichen Bestandteile wurde jeweils 10 Minuten zentrifugiert (4°C, 4000 U/min). Die wässrigen bzw. organischen Phasen wurden zusammengegeben und wie unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben weiter aufgearbeitet. Pro Verfahren wurden vier Proben von ca. 500 mg extrahiert.

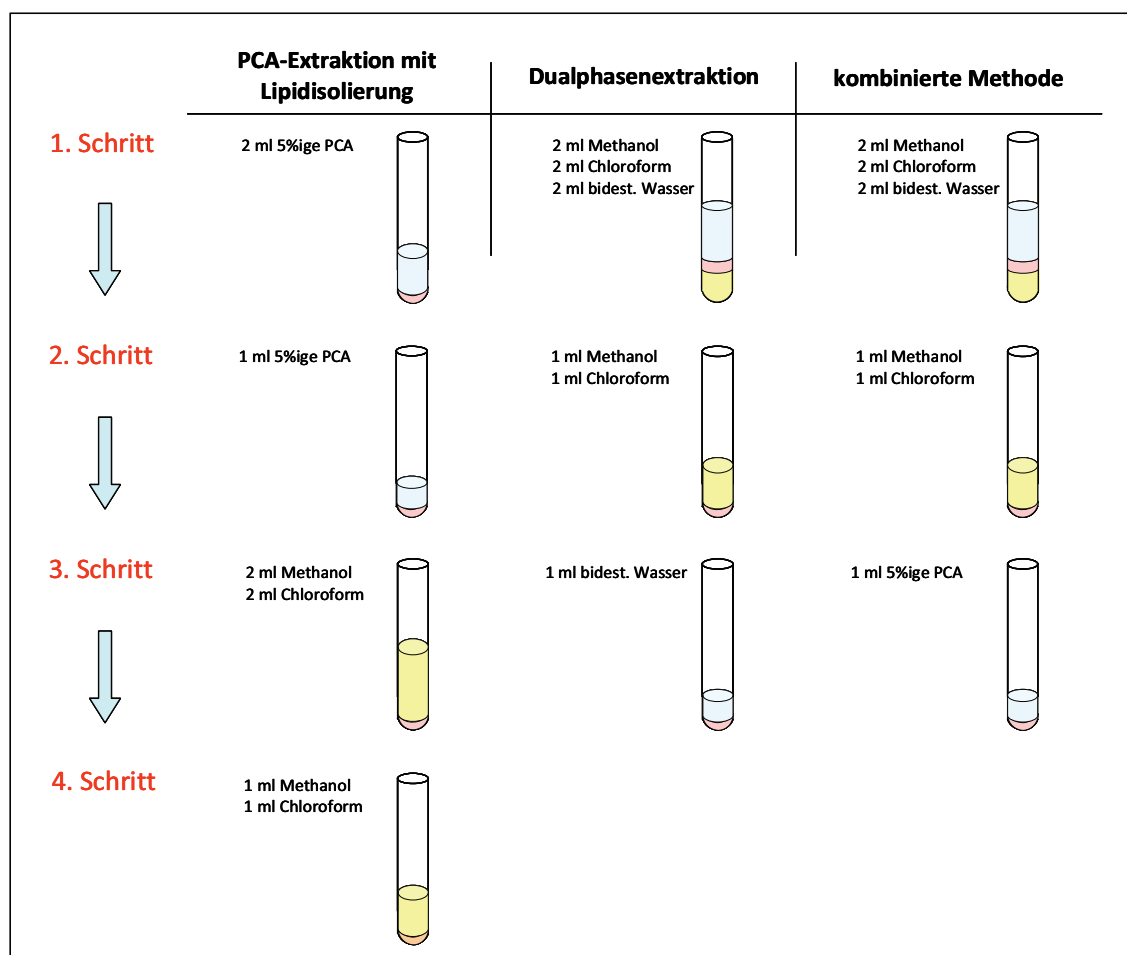


Abbildung 53: Vorgehen für den Vergleich der weiterentwickelten Extraktionstechnik (kombinierte Methode) mit den bestehenden Verfahren.

5.2 Gewebeextraktion

5.2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte und Chemikalien sind den Abschnitten 5.1.1 und 5.1.2 zu entnehmen.

5.2.2 Durchführung

Der gesamte Extraktionsvorgang erfolgte mit eisgekühlten Materialien (Zentrifugenröhrchen, Potter etc.) und Lösungsmitteln. Die Biopsate wurden in gefrorenem Zustand gewogen (10 mg bis 2500 mg) und Proben schwerer als 250 mg unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Gewebe wurde anschließend in einen Potter überführt und in einem ersten Extraktionsvorgang (CMB-Methode) wurden hydrophile Metaboliten und Lipide extrahiert. Dafür wurde mit 2 ml Methanol mit 20 Hüben bei 800 U/min gepottert. Daraufhin wurde die Probe mit 2 ml Chloroform versetzt und nochmals homogenisiert (20 Hübe, 800 U/min). Darauffolgend wurden 2 ml bidestilliertes Wasser dazugegeben und wie zuvor gepottert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und der Potter mit je 500 µL Chloroform, Methanol bzw. Bidest ausgewaschen. Die Waschphasen wurden zum Homogenat hinzugegeben und zur Phasentrennung wurde 30 Minuten bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Die Chloroform-Phase mit den Lipiden (unten) wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt, die wässrig methanolische Phase mit den wasserlöslichen Metaboliten (oben) in ein 30 ml Polyethylen-Röhrchen mit Schraubkappe.

Die zweite Extraktion des zurückgebliebenen Pellets erfolgte mit je 1 ml Chloroform und Methanol, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 4°C, 4000 U/min). Restliche polare Komponenten wurden in einem dritten Extraktionsschritt mit 1 ml 5%iger PCA isoliert und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (10 min, 4°C, 4000 U/min).

Anschließend wurden die Lipidphasen der ersten und zweiten Extraktion vereinigt, einmal mit 1 ml bidest. Wasser gewaschen, im N₂-Strom eingedampft und in 600 µL CDCl₃/MeOD (2:1) aufgenommen und analysiert. Für die Lagerung wurden die Extrakte wieder eingedampft, in 1 ml CHCl₃ aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Auch die hydrophilen Phasen der ersten und dritten Extraktion wurden vereinigt, vom Methanol befreit und mit 6 M bzw. 0.6 M Kaliumhydroxidlösung neutralisiert (pH-Wert 7.00). Ausgefallenes Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert und der Überstand über Nacht lyophilisiert. Am Tag der Messung wurde das Lyophilisat in 600 µL D₂O aufgenommen, pH 7.00 eingestellt und NMR spektroskopisch analysiert.

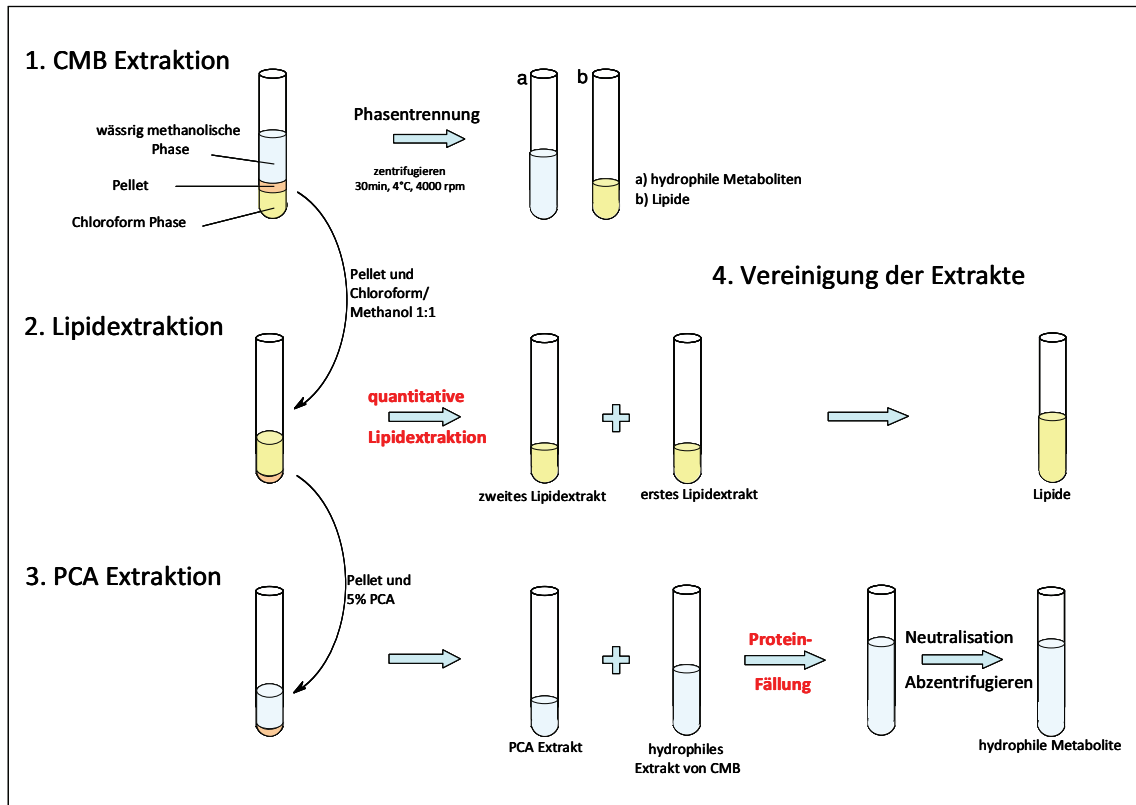


Abbildung 54: Ablauf der Extraktionsprozedur.

5.3 Festphasenextraktion

5.3.1 Materialien

Aminopropyl-Kartusche	NH ₂ Chromabond 1000 mg/6 ml, 45 µm	Macherey-Nagel, Düren
Silicagel-Kartusche	SiOH Chromabond 500 mg/6 ml, 45 µm selbstgepackt	Macherey-Nagel, Düren

5.3.2 Chemikalien

Ammoniumacetat	<i>p.a. (98%)</i>	Riedel de Haën, Seelze
Chloroform	<i>AnalaR Normarpur</i>	VWR, Darmstadt
Diethylether	<i>p.a.</i>	Riedel de Haën, Seelze
Essigsäure	<i>Reag. Ph Eur (p.a.)</i>	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	<i>analytical reagent</i>	Lab Scan
Hexan	<i>Rotisolv, HPLC grade</i>	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	<i>p.a. (≥ 99.7%)</i>	Roth, Karlsruhe
Methanol	<i>LC-MS Chromasolv</i>	Riedel de Haën, Seelze

5.3.3 Durchführung

Die Festphasenextraktion erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die neutralen Lipide von den freien Fettsäuren und den neutralen und sauren Phospholipiden über eine Aminopropyl-Kartusche getrennt. Im zweiten Schritt erfolgte die weitere Auftrennung der neutralen Lipide über eine selbst gepackte Silicagel-Kartusche. Beide Kartuschen wurden vor der Auftrennung mit jeweils 15 ml Hexan konditioniert. Die verschiedenen Fraktionen wurden in Zentrifugengläsern aufgefangen.

Der Lipidextrakt, gelöst in 0.5 ml Chloroform, wurde auf die konditionierte Aminopropyl-Kartusche aufgetragen. Die Elution der neutralen Lipide erfolgte mit 8 ml Chloroform/Isopropanol (3:1) (Lösungsmittel A). Anschließend wurden die freien Fettsäuren mit 8 ml Diethylether/Essigsäure (98:2) (Lösungsmittel B) abgetrennt. Die Phospholipide eluierten mit 10 ml Methanol (Lösungsmittel C-1, PL₁-Fraktion) und verbliebene saure Phospholipide (PL₂-Fraktion) wurden mit 10 ml eines Gemischs aus Chloroform/Methanol (2:1), welches 0.2 M Natriumacetat enthielt (Lösungsmittel C-2), von der Säule gewaschen.

Die Fraktion der neutralen Lipide wurde im Stickstoffstrom eingedampft, in 0.5 ml Chloroform aufgenommen und auf die konditionierte Silicagelkartusche aufgegeben. Im ersten Extraktionsschritt wurden die Cholesterylester mit 10 ml Hexan/Diethylether (98:2) (Lösungsmittel D) isoliert, gefolgt von den Triacylglyceriden, die mit 10 ml Hexan/Diethylether (90:10) (Lösungsmittel E) abgetrennt wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Elution von Cholesterol mit 10 ml Hexan/Ethylacetat (91:9) (Lösungsmittel F). In den letzten beiden Extraktionsschritten wurden die Diacylglyceride von den Monoacylglyceriden getrennt, indem mit 10 ml Hexan/Ethylacetat (85:15) (Lösungsmittel G) bzw. 10 ml Chloroform/Methanol (1:1) (Lösungsmittel H) eluiert wurde.

Alle Fraktionen wurden im Stickstoffstrom eingedampft und für die NMR-spektroskopische Analyse in 400 µL CDCl₃/MeOD (2:1) gelöst. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte wie unter Punkt 5.2 beschrieben.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Lipide (gelöst in Chloroform) 1:10 bzw. 1:100 mit MeOH verdünnt.

5.4 Massenspektrometrie

Es wurde mit einem *Bruker Esquire LC* Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) gearbeitet. Der Probeneinlass erfolgte über eine direkte Injektions mittels einer Spritzenpumpe. Das Massenspektrometer besitzt eine Elektrospray-Ionenquelle, eine Ionenfalle als Analysator und einen Channeltron-Detektor. Bruker Data Analysis 3.0 (Bruker) wurde für die Datenverarbeitung verwendet.

Es wurden folgende Einstellungen gewählt:

Nebulizer Gas:	5 psi
Trockengas	5 L/min
Trockentemperatur	300 °C
Kapillarspannung:	(-)4000 V

Scan Bereich, Target Mass und Compound Stability wurden an die Proben angepasst.

5.5 NMR-Spektroskopie

5.5.1 Geräte

Die NMR-spektroskopischen Analysen erfolgten bei 14,1 T Feldstärke an einem Bruker *Avance DRX-600* Spektrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe) mit einem 5 mm H,C,N invers Probenkopf mit aktiv abgeschirmten Feldgradienten. Für die Verarbeitung der Daten wurde Topspin 1.3 (Bruker) und Mestrec 4.9.9.9 (Mestrelab) eingesetzt. Die Spektrenparameter wurden für die verschiedenen Fragestellungen optimiert und an die Proben angepasst.

5.5.2 Deuterierte Lösungsmittel

CDCl ₃	99.96% Deuterierungsgrad	Sigma Aldrich, München
DCI	99% Deuterierungsgrad	Sigma Aldrich, München
D ₂ O	99.98% Deuterierungsgrad	Sigma Aldrich, München
d4-MeOD	99.96% Deuterierungsgrad	Sigma Aldrich, München
TSP	98% Deuterierungsgrad	Sigma Aldrich, München

5.5.3 ¹H-NMR-Spektren für die Mustererkennung

Hydrophile Extrakte. Die ¹H-NMR-Spektren der wasserlöslichen Extrakte wurden mit einer Wasservorsättigungssequenz aufgenommen. Dafür wurde die Trägerfrequenz auf das Wassersignal gesetzt und die Pulsleistung der Wassersättigung auf die Probe eingestellt (2s, pl9 55-65 dB). Die Empfängerleistung wurde ebenfalls an die Probe angepasst. Die Spektren wurden auf die Methylgruppe des Creatins (Singulett) bei 3.03 ppm kalibriert.

Lipide. Für die lipophilen Extrakte wurde eine gängige ¹H-NMR-Sequenz verwendet. Auch hier wurde die Empfängerleistung an die Proben angepasst. Zur Kalibrierung wurde das Methanol Quintett bei 3.34 ppm verwendet.

Tabelle 11: NMR-Paramter zur Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren.

Parameter	Abk.	Hydrophile Extrakte	Lipide
Messtemperatur [K]	T	300	300
Spektrenbreite [Hz/ppm]	SW	6613.76/11.019	5208.33/8.677
Mitte des Spektrums [Hz/ppm]	O1	2820.84 ± 2/ 4.700 ± 0.002	2400.88/4.000
Anzahl der Datenpunkte	TD	16384	16384
Anzahl der Scans	NS	512	512
Dummy Scans	DS	8	8
Akquisitionszeit [s]	AQ	1.24	1.57
Wartezeit [s]	d1	2	2
Empfängerleistung	rg	512-2048	256/1024
Pulsleistung [dB]	pl1	0	0
Pulslänge [μs]	p1	6 (71°)	6.1-6.4 (83.5°)

5.5.4 ^1H -NMR-Spektren zur Quantifizierung

Hydrophile Extrakte: Für die Quantifizierung der hydrophilen Extrakte wurde eine spezielle Sequenz verwendet, bei der die Wassersättigung über die ^{13}C -Spule erfolgt. Somit kann die Wasserunterdrückung unabhängig von der d1 Zeit ($= 5 \cdot T_1$) eingestellt werden. Als Referenzstandard wurde eine TSP-Kapillare (Trimethylsilyl-d4-propionat (Natriumsalz) in D_2O) mit einem Gehalt von $4.0 \mu\text{mol}$ eingesetzt. Zur Kalibrierung wurde das TSP-Signal auf 0.00 ppm gesetzt.

Lipide: Für die lipophilen Extrakte wurde eine gängige ^1H -NMR-Sequenz verwendet mit $d1 = 5 \cdot T_1$. Auch hier wurde die Empfängerleistung angepasst. Als Referenzstandard wurde eine TSP-Kapillare (TSP gelöst in $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 2:1) mit einem Gehalt von $0.48 \mu\text{mol}$ eingesetzt. Auch hier wurden die Spektren auf das TSP-Signal bei 0.00 ppm kalibriert.

Tabelle 12: NMR-Parameter zur Quantifizierung der Metabolite.

Parameter	Abk.	Hydrophile Extrakte	Lipide
Messtemperatur [K]	T	300	300
Spektrenbreite [Hz/ppm]	SW	6613.76/11.019	4807.69/8.009
Mitte des Spektrums [Hz/ppm]	O1	2820.84/4.700	2100.77/3.500
	O2	$2820.84 \pm 2/$ 4.700 ± 0.002	-
Anzahl der Datenpunkte	TD	32768	32768
Anzahl der Scans	NS	64	64
Dummy Scans	DS	8	8
Akquisitionszeit [s]	AQ	2.48	3.41
Wartezeit [s]	d1	17.2	23.2
Empfängerleistung	rg	512-2048	256/1024
Pulsleistung [dB]	pl1	0	0
Pulslänge [μs]	p1	6 (71 °)	6.1-6.4 (83.5 °)

5.5.5 2D NMR-Spektren

Im Folgenden sind die Einstellungen für die 2D homo- und heteronuklearen NMR-Spektren angegeben. Die Auflösung in F1 und die Anzahl der Scans wurden durch die vorhandene Messzeit, die Probenkonzentration und die benötigte Auflösung bestimmt. Angegeben sind jeweils exemplarische Einstellungen. Ebenso wurden die 90° Hard- und Softpulse an die Proben angepasst und die Mischzeit an die Fragestellung.

Tabelle 13: Einstellungen für die 2D NMR-Spektren (Lipide).

Parameter	Abk.	¹ H, ¹ H- TOCSY	¹ H, ¹ H- COSY	¹ H, ¹³ C- HSQC	¹ H, ¹³ C- HSQC- TOCSY	¹ H, ¹³ C- HMBC
Messtemperatur [K]	T	300	300	300	300	300
Spektrenbreite [F ₂ /F ₁]	SW	6.98/7.00	6.98/7.00	8.00/140	8.00/140	8.00/200
Mitte des Spektrums [F ₂ /F ₁]		3.50/3.50	3.50/3.50	3.00/75	3.00/75	4.00/100
Anzahl der Datenpunkte [F ₂ /F ₁]	TD	4096/1024	4096/1024	4096/1024	2046/1024	4096/1024
Anzahl der Scans	NS	24	56	32	144	192
Dummy Scans	DS	256	128	256	256	256
Empfängerleistung	rg	2048	2048	64k	64k	64k
90° Hardpuls [μs/dB]	p1/pl1	7.3-9.0/ 0-3	7.0/ 0	7.3-9.0/ 0-3	7.3-9.0/ 0-3	7.3-9.0/ 0-3
90° Softpuls [μs/dB]	p6/pl10	32/ 13.7	-	-	32/ 13.0-14.5	32/ 13.0-14.5
Mischzeit [ms]	d9	60-180	-	-	35	35-60

Bei den Lipiden ist es ebenfalls möglich die Auflösung in den HSQC-Spektren durch Faltung zu erhöhen. Hierfür müssen lediglich die spektrale Weite in F1 auf 34 ppm und die Mitte des Spektrums auf 61 ppm gesetzt werden.

Tabelle 14: Einstellungen für die 2D NMR-Spektren (hydrophile Metabolite).

Parameter	Abk.	¹ H, ¹³ C- HSQC	¹ H, ¹³ C- HSQC- TOCSY
Messtemperatur [K]	T	300	300
Spektrenbreite [F ₂ /F ₁]	SW	9.50/150	9.50/150
Mitte des Spektrums [F ₂ /F ₁]		4.75/75	4.75/75
Anzahl der Datenpunkte [F ₂ /F ₁]	TD	4096/512	2046/1024
Anzahl der Scans	NS	80	80
Dummy Scans	DS	256	256
Empfängerleistung	rg	64k	64k
90° Hardpuls [μs/dB]	p1/pl1	7.5/1	7.5/1
90° Softpuls [μs/dB]	p6/pl10		32/14.0
Mischzeit [ms]	d9		30

5.5.6 Spektrenprozessierung

Die aufgenommenen FIDs (*free induction decay*) der lipophilen und hydrophilen Extrakte (16k bzw. 32k Datenpunkte) wurden mittels einer *linear prediction* auf 64k aufgefüllt und mit einer Exponentialfunktion (Linienbreite 0.1) apodisiert. Die Phasenkorrektur erfolgte manuell, während für die Basislinienkorrektur der *Witthaker Smoother* verwendet wurde.

5.5.7 Signalzuordnungen

Die Signalzuordnung in den Spektren erfolgte anhand verschiedener 2D NMR-Experimente, durch den Vergleich mit aufgenommenen Referenzspektren von Standardsubstanzen und durch einen Abgleich mit Literaturwerten.^{[61],[70],[200],[201]}

5.6 Biopsate

Die in dieser Arbeit untersuchten Hirntumorbiopsate wurden nach der Resektion in aktives Tumorgewebe (ohne nekrotische Anteile) und wenn möglich in Randgebiet und entferntes Randgebiet unterteilt und umgehend bei -80 °C eingefroren. Insgesamt wurden von 60 Biopsaten hydrophile und lipophile Extrakte erstellt, von denen jedoch 6 Proben von der Untersuchung ausgeschlossen werden mussten. Somit wurden 30 Gehirntumorbiopsate, 20 Gewebeproben aus dem Randgebiet und 4 aus dem entfernten Randgebiet untersucht. Darunter befanden sich maligne astrozytäre Tumoren von WHO Grad III und IV und zwei weitere Tumorentitäten:

- | | |
|---|--------------------------|
| • Glioblastoma multiforme (GBM) IV: | 15 Biopsate (3 Rezidive) |
| • Riesenzellglioblastom (RZG) IV: | 1 Biopsat |
| • Anaplastisches Astrozytom (AA) III: | 7 Biopsate (1 Rezidiv) |
| • Anaplastisches Oligoastrozytom (OA) III: | 2 Rezidive |
| • Oligodendrogliom (OL) III: | 1 Rezidiv |
| • Astrozytom (AS): | 2 Biopsate (1 Rezidiv) |
| • Kraniopharyngeom: (I) | 1 Biopsat |
| • Hypophysenadenom mit Expression
von Prolaktin: | 1 Biopsat |

In Tabelle 15 sind die untersuchten Tumoren mit Informationen zu Alter, Geschlecht und Lokalisation des entnommenen Gewebes aufgelistet.

Tabelle 15: Auflistung der untersuchten Tumoren.

Tumor	Rezidiv	Lokalisation und Einwaage			Geschlecht	Alter [Jahre]
		Tumorzentrum	Tumorrand	Entf. Randgebiet		
GBM mit oligodendroglialer Komponente (IV)	x	2490 mg	29 mg	43 mg	M	61
GBM (IV)	-	208 mg	66 mg	-	M	36
AA (III)	-	1360 mg	77 mg	-	M	38
GBM (IV)	x	283 mg	67 mg	-	W	37
GBM (IV)	x	1000 mg	26 mg	-	W	52
Kraniopharyngeom	-	144 mg	-	-	M	36
Hypophysenadenom	-	9 mg	-	-	M	37
Astrozytom	x	127 mg	-	-	M	23
Anaplastisches Oligoastrozytom (III)	x	120 mg	47 mg	62 mg	M	31
GBM (IV)	-	493 mg	39 mg	-	M	47
AA (III)	-	54 mg	58 mg	-	M	49
GBM (IV)	-	45 mg	65 mg	-	M	54
GBM mit oligodendroglialer Komponente (IV)	-	492 mg	75 mg	-	W	59
Anaplastisches Oligoastrozytom (III)	X	83 mg	-	-	W	41
GBM mit oligodendroglialer Komponente (IV)	-	662 mg	-	-	W	56
Riesenzellglioblastom	-	453 mg	170 mg	-	W	29
Oligodendrogliom (III)	x	262 mg	160 mg	123 mg	M	53
GBM (IV)	-	64 mg	87 mg	47 mg	M	51
GBM mit oligodendroglialer Komponente (IV)	-	364 mg	207 mg	-	W	71
GBM(IV)	-	357 mg, 161 mg	82 mg	-	M	71
AA (III)	-	92 mg	86 mg	-	M	34
Astrozytom	-	485 mg	-	-	M	36
AA (III)	-	85 mg	-	-	W	50
GBM (IV)	-	462 mg	-	-	M	45
AA (III)	-	65 mg	21 mg	-	M	48
AA (III)	x	71 mg	28 mg	-	M	39
Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente (IV)	-	158 mg	375 mg	-	M	44
AA (III)	-	213 mg	131 mg	-	W	36
GBM (IV)	-	67 mg	-	-	M	55

5.7 Mustererkennung

Die Bestimmung charakteristischer Metabolite für die Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum, Randgebiet und entferntem Randgebiet erfolgte anhand der malignen astrozytären Tumoren (Grad III und IV).

5.7.1 Vorverarbeitung der Spektren für die Klassifikation:

Die NMR-Analyse und die Spektren-Prozessierung wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 5.5.3 bzw. 5.5.6).

Für die Vorverarbeitung und Klassifikation wurden die NMR-Spektren in einer Datenmatrix zusammengefasst (m Spektren \times n Datenpunkte (Variablen)) und weiter verarbeitet (MATLAB R2009a, MathWorks, Natick, USA). Zunächst erfolgte eine Signalanpassung der Spektren untereinander (*peak alignment*). Hierfür kam bei den Lipiden ein genetischer Algorithmus (*PAGA: peak alignment by a genetic algorithm*) zum Einsatz^{[261],[262]}. Die Spektren der wasserlöslichen Metabolite wurden über ein *interval correlated shifting* (icoshift)^[263] angeglichen, das ebenfalls als Matlab-Tool zur Verfügung stand (Referenz [264]).

Nach der Signalanpassung wurden Wasser-, Lösungsmittel- und Fremdsignale (Mannitol bei den hydrophilen Extrakten, Ethanol bei den Lipidextrakten) aus den Spektren entfernt und es erfolgte eine Normierung auf das Gesamtintegral. Zur Datenreduktion wurden die Spektren auf den relevanten Bereich reduziert (hydrophile Extrakte: 0.80 bis 9.46 ppm, lipophile Extrakte: 0.50 bis 6.70 ppm) und in signalangepasste (nicht äquidistante) Segmente unterteilt. Hierfür wurden die Intervallgrenzen in die lokalen Minima gelegt und die Bereiche integriert. Es ergaben sich für die Spektren der wasserlöslichen Metabolite 286 Segmente (Variablen). Die Lipidspektren wurden in 245 Segmente unterteilt.

Anschließend wurden Ausreißer korrigiert, indem diese auf einen Grenzwert (Mittelwert \pm $3 \times$ Standardabweichung) gesetzt wurden. Um die unterschiedlich konzentrierten Metabolite/Variablen gleich zu gewichten, wurden die Variablen zentriert und skaliert (*autoscaling*), indem die Differenz aus Variable und Mittelwert durch die Standardabweichung dividiert wurde. Somit werden die Mittelwerte aller Variablen auf 0 gesetzt und die Standardabweichung auf 1. Damit ist eine gleiche Gewichtung aller Komponenten gewährleistet.

5.7.2 Klassifikation

Die für eine Unterscheidung der verschiedenen Gewebearten relevanten Variablen wurden über eine PLS-Regression (Unscrambler X, Camo Software AS, Oslo, Norwegen) bestimmt. Dazu wurde zunächst ein PLS-Modell basierend auf allen Variablen erstellt und die relevanten Variablen anhand der gewichteten *Loadings* und der Regressionskoeffizienten bestimmt. Die Berechnung erfolgte über den NIPALS-Algorithmus mit einer leave-one-out Validierung. In einem nächsten Schritt schloss sich die Optimierung des Modells an, indem nur die relevanten Variablen für eine Regression verwendet wurden. Die Score-Plots der optimierten Modelle dienten der Visualisierung.

Zudem wurde die Güte der Variablen für eine Unterscheidung anhand einer LDA-Klassifikation bestimmt (MATLAB R2009a). Hierfür wurden die Korrektklassifikationsraten der einzelnen Variablen und von Variablenkombinationen (zwei bis fünf Variablen) berechnet. Dies erfolgte mit einer vierfachen, stratifizierten Kreuzvalidierung, die zehnmal mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Trainings- und Testsets wiederholt wurde. Die Korrektklassifikationsraten wurden anschließend über die 40 Klassifikationsläufe gemittelt.

Die anhand der PLS und LDA als relevant eingestuften Variablen wurden anschließend für die Bildung von SOMs (self-organizing maps) herangezogen, um die Ergebnisse zu visualisieren. Die Bildung der SOMs erfolgte mittels einer Matlab-Toolbox^{[244],[265]}.

Literaturverzeichnis

- [1] **Derr, T.**; Els, T.; Gyngell, M.; Leibfritz, D. (1997): Characterisation of Tumorous Tissue in Rat Brain by In Vitro Magnetic Resonance Spectroscopy and Artificial Neural Networks. In: Keravnou, E.; Baud, R.; Wyatt, J. (Herausgeber): Lecture Notes in Computer Science. Vol. 1211, Proceedings of the 6th Conference on Artificial Intelligence in Medicine in Europe. *Springer Verlag*, Berlin Heidelberg, S. 457-460.
- [2] Ohgaki, H.; Kleihues, P. (2005): Epidemiology and Etiology of Gliomas. *Acta Neuropathol.* **109**: 93-108.
- [3] Lacroix, M.; Abi-Said, D.; Fourney, D.R.; Gokaslan, Z.L.; Shi, W.; DeMonte, F.; Lang, F.F.; McCutcheon, I.E.; Hassenbusch, S.J.; Holland, E.; Hess, K.; Michael, C.; Miller, D.; Sawaya, R. (2001): A Multivariate Analysis of 416 Patients with Glioblastoma Multiforme: Prognosis, Extent of Resection, and Survival. *J. Neurosurg.* **95**: 190-198.
- [4] **Trepel, M.** (2006): Neuroanatomie Struktur und Funktion. 3., neu bearbeitete Auflage, Nachdruck, *Urban und Fischer*, München, S. 2.
- [5] **Thews, G.**; Mutschler, E.; Vaupel, P. (1999): Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. 5. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, Stuttgart, S. 605-618.
- [6] **Kandel, E.R.**; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. (1995): Neurowissenschaften. Eine Einführung. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg Berlin Oxford, S.10ff.
- [7] Sutter, R.; Yadirgi, G.; Marino, S. (2007): Neural Stem Cells and Brain Tumours: Dangerous Relationships? *Biochim. Biophys. Acta* **1776**: 125-137.
- [8] **Rosenberg, G.A.** (1990): Brain Fluids and Metabolism. *Oxford University Press*, Oxford, S. 7-14.
- [9] **Nelson, D.**; Cox, M. (2001): Lehninger Biochemie. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, *Springer Verlag*, Berlin, S. 948-949.
- [10] **Wagener, C.** (1999): Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, S.1-3.
- [11] Becker N., Wahrendorf J. (1998): Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. *Springer Verlag*, Berlin Heidelberg New York. Und: Fortschreibung im Internet: URL: <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/index.html> (aktuell am 15.07.2011).
- [12] Legler, J.M.; Ries, L.A.; Smith, M.A. (1999): Brain and Other Central Nervous System Cancers: Recent Trends in Incidence and Mortality. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 1382-1390.
- [13] 2009-2010 CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006. Published by the Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. URL: www.cbtrus.org
- [14] Wrensch, M.; Minn, Y.; Chew, T.; Bondy, M.; Berger, M.S. (2002): Epidemiology of Primary Brain Tumors: Current Concepts and Review of Literature. *Neuro Oncol.* **4**: 278-299.

- [15] **Louis, D.N.**; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K. (2007): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *IARC*, Lyon.
- [16] **Schlegel, U.**; Weller, M.; Westphal, M. (2003): Neuroonkologie. 2., erweiterte Auflage, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart. S.2ff
- [17] **Ernest, N.J.**; Sontheimer, H. (2009): Glioma. In: Squire, L.R. (Herausgeber): Encyclopedia of Neurosciences. *Academic Elsevier*, London, S. 877-884.
- [18] **Schlegel, J.**; Herms, J. (2007): WHO Klassifikation der Tumoren des Nervensystems. In: Tonn, J.C.; Kreth, F.W.; Goldbrunner, R.; Meyer, B. (Herausg.): Manual Hirntumoren und Spinale Tumoren., 3. Auflage, *W. Zuckerschewdt Verlag*, München, S. 2-16. (URL: http://tumorzentrum-muenchen.de/fileadmin/manuale/923_Manual_Hirntumoren.pdf (aktuell am 13.07.2011))
- [19] Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. (2007): The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* **114**: 97-109.
- [20] **Lodish, H.**; Berk, A.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Bretscher, A.; Ploegh, H. ; Matsudeira, P. (2008): Molecular Cell Biology., 6.Auflage, *W.H. Freeman and Company*, New York, S. 847ff, 1107ff.
- [21] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell.* **100**: 57-70.
- [22] **Fedi, P.**; Tronick, S.R.; Aaronson, S.A. (1997): Growth Factors. In: Holland, J.F.; Bast, R.C.; Morton, D.L.; Frei, E.; Kufe, D.W.; Weichselbaum, R.R. (Herausgeber): Cancer Medicine. *Williams and Wilkins*, Baltimore, S. 41-67.
- [23] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2011): The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**: 646-674.
- [24] Gatenby, R.A.; Gillies, R.J. (2008): A Microenvironmental Model of Carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 56-61.
- [25] Huse, T.H.; Holland, E.C. (2010): Targeting Brain Cancer: Advances in the Molecular Pathology of Malignant Glioma and Medulloblastoma. *Nat. Rev Cancer* **10**: 319-331.
- [26] Jung, V.; Romeike, B.F.M.; Henn, W.; Feiden, W.; Moringlane, J.R.; Zang, K.D.; Urbschat, S. (1999): Evidence of Focal Genetic Microheterogeneity in Glioblastoma Multiforme by Area-Specific CGH on Microdissected Tumor Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**: 993-999.
- [27] Coons, S.W.; Johnson, P.C. (1993): Regional Heterogeneity in the Proliferative Activity of Human Gliomas as Measured by the Ki-67 Labeling Index. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **52**: 609-618.
- [28] Kros, J.M.; van Run, P.R.W.A.; Alers, J.C.; Avezaat, C.J.J.; Luider, T.M.; van Dekken, H. (2001): Spatial Variability of Genomic Aberrations in a Large Glioblastoma Resection Specimen. *Acta Neuropathol.* **102**: 103-109.
- [29] Coons, S.W.; Johnson, P.C.; Shapiro, J.R. (1995): Cytogenetic and Flow Cytometry DNA Analysis of Regional Heterogeneity in a Low Grade Human Glioma. *Cancer Research* **55**: 1569-1577.
- [30] Bertout, J.A.; Shetal, A.P.; Simon, C.M. (2008): The Impact of O₂ Availability on Human Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**: 967-975.
- [31] Gillies, R.J.; Robey, I.; Gatenby, R.A. (2008): Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancer. *J. Nuc. Med.* **49**: 24S-42S.

- [32] Stubbs, M.; McSheehy, P.M.J.; Griffiths, J.R.; Bashford, L. (2000): Causes and Consequences of Tumour Acidity and Implications for Treatment. *Mol. Med. Today* **6**: 15-19.
- [33] Matés, J.M.; Segura, J.A.; Campos-Sandoval, J.A.; Lobo, C.; Alonso, L.; Alonso, F.J.; Márquez, J. (2009): Glutamine Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**: 2051-2069.
- [34] Mazurek, S.; Boschek, C.B.; Hugo, F.; Eigenbrodt, E. (2005): Pyruvate Kinase Type 2 and Its Role in Tumor Growth and Spreading. *Semin. Cancer Biol.* **15**: 300-308.
- [35] Nadal, L.; Leray, G.; Desbarts, C.; Darcel, F.; Bansard, J.-Y.; Bondon, A.; de Certaines, J. (1997): Proton and Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Human Brain Tumor Extracts with Automatic Data Classification: A Preliminary Study. *Cell. Mol. Biol.* **43**: 659-673.
- [36] Leibfritz, D. (1996): An Introduction to the Potential of ^1H -, ^{31}P - and ^{13}C -NMR-Spectroscopy. *Anticancer Res.* **16**: 1317-1324.
- [37] Nicholson, J.K.; Wilson, I.D. (1989): High Resolution Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Biological Fluids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **21**: 449-501.
- [38] Martínez-Bispa, M.C.; Martí-Bonmatí, L.; Piquer, J.; Revert, A.; Ferrer, P.; Llácer, J.L.; Piotto, M.; Assemat, O.; Celda, B. (2004): ^1H and ^{13}C HR-MAS Spectroscopy of Intact Biopsy Samples Ex Vivo and In Vivo ^1H MRS Study of Human High Grade Gliomas. *NMR Biomed.* **17**: 191-205.
- [39] Fan, T.W.-M.; Lane, A.N. (2008): Structure-based Profiling of Metabolites and Isotopomers by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **52**: 69-117.
- [40] Mountford, C.; Ramadan, S.; Stanwell, P.; Malycha, P. (2009): Proton MRS of the Breast in the Clinical Setting. *NMR Biomed.* **22**: 54-64.
- [41] Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. (1999): 'Metabonomics': Understanding the Metabolic Responses of Living systems to Pathophysiological Stimuli via Multivariate Statistical Analysis of Biological NMR Spectroscopic Data. *Xenobiotics*. **29**: 1181-1189.
- [42] Sitter, B.; Bathen, T.F.; Tessem, M.-B.; Gribbestad, I.S. (2009): High-Resolution Magic Angle Spinning (HR MAS) MR Spectroscopy in Metabolic Characterization of Human Cancer. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **54**: 239-254.
- [43] Shank, R.P.; Aprison, M.H. (1971): Post Mortem Changes in the Content and Specific Radioactivity of Several Amino Acids in Four Areas of the Rat Brain. *J. Neurobiol.* **2**: 145-151.
- [44] Perry, T.L.; Hansen, S.; Gandham, S.S. (1981): Postmortem Changes of Amino Compounds in Human and Rat Brain. *J. Neurochem.* **36**: 406-412.
- [45] Opstad, K.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. (2008): An Assessment of the Effects of Sample Ischaemia and Spinning Time on the Metabolic Profile of Brain Tumour Biopsy Specimens as Determined by High-Resolution Magic Angle Spinning ^1H NMR. *NMR Biomed.* **21**: 1138-1147.
- [46] Petroff, O.A.C.; Ogino, T.; Alger, J.R. (1988): High-Resolution Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Rabbit Brain: Regional Metabolite Levels and Postmortem Changes. *J. Neurochem.* **51**: 163-171.
- [47] Jordan, K.W.; He, W.; Halpern, E.F.; Wu, C.-L.; Cheng, L.L. (2007): Evaluation of Tissue Metabolites with High Resolution Magic Angle Spinning MR Spectroscopy Human Prostate Samples After Three-Year Storage at -80°C . *Biomark. Insights* **2**: 147-154.

- [48] Middleton, D.A.; Bradley, D.P.; Connor, S.C.; Mullins, P.G.; Reid, D.G. (1998): The Effect of Sample Freezing on Proton Magic-Angle Spinning NMR Spectra of Biological Tissue. *Magn. Reson. Med.* **40**: 166-169.
- [49] Waters, N.J.; Garrod, S.; Farrant, R.D.; Haselden, J.N.; Connor, S.C.; Conelly, J.; Lindon, J.C.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. (2000): High-Resolution Magic Angle Spinning ^1H NMR Spectroscopy of Intact Liver and Kidney: Optimization of Sample Preparation Procedures and Biochemical Stability of Tissue During Spectral Acquisition. *Anal. Biochem.* **282**: 16-23.
- [50] Wu, C.-L.; Taylor, J.L.; He, W.; Zepeda, A.G.; Halpern, E.F.; Bielecki, A.; Gonzalez, G.; Cheng, L.L. (2003): Proton High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Analysis of Fresh and Previously Frozen Tissue of Human Prostate. *Magn. Reson. Med.* **50**: 1307-1311.
- [51] Zellner, M.; Winkler, W.; Hayden, H.; Diestinger, M.; Eliassen, M.; Gesslbauer, B.; Miller, I.; Chang, M.; Kungl, A.; Roth, E.; Oehler, R. (2005): Quantitative Validation of Different Protein Precipitation Methods in Proteome Analysis of Blood Platelets. *Electrophoresis* **26**: 2481-2489.
- [52] McDowall, R.D. (1989): Sample Preparation for Biomedical Analysis. *J. Chromatogr.* **492**: 3-58.
- [53] Blanchard, J. (1981): Evaluation of the Relative Efficacy of Various Techniques for Deproteinizing Plasma Samples Prior to High-Performance Liquid Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr.* **226**: 455-460.
- [54] Tyagi, R.K.; Azrad, A.; Degani, H.; Salomon, Y. (1996): Simultaneous Extraction of Cellular Lipids and Watersoluble Metabolites: Evaluation by NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **35**: 194-200.
- [55] Fan, T.W.-M.; Colmer, T.D.; Lane, A.D.; Higashi, R.M. (1993): Determination of Metabolites by ^1H NMR and GC: Analysis for Organic Osmolytes in Crude Tissue Extracts. *Anal. Biochem.* **214**: 260-271.
- [56] Gradwell, M.J.; Fan, T.W.-M.; Lane, A.N. (1998): Analysis of Phosphorylated Metabolites in Crayfish Extracts by Two Dimensional ^1H - ^{31}P NMR Heteronuclear Total Correlation Spectroscopy (heteroTOCSY). *Anal. Biochem.* **263**: 139-149.
- [57] Cerdán, S.; Parilla, R.; Santoro, J.; Rico, M. (1985): ^1H NMR Detection of Cerebral myo-Inositol. *FEBS Lett.* **187**: 167-172.
- [58] Howells, S.L.; Maxwell, R.J.; Griffiths, J.R. (1992) Classification of Tumour ^1H NMR Spectra by Pattern Recognition. *NMR Biomed.* **5**: 59-64.
- [59] Peeling, J.; Sutherland, G. (1992): High Resolution ^1H -NMR Spectroscopy Studies of Extracts of Human Cerebral Neoplasms. *Magn. Reson. Med.* **24**: 123-136.
- [60] Gribbestad, I.S.; Petersen, S.B.; Fjøsne, H.E.; Kvinnsland, S.; Krane, J. (1994): ^1H NMR Spectroscopic Characterization of Perchloric Acid Extracts from Breast Carcinomas and Non-involved Breast Tissue. *NMR Biomed.* **7**: 181-194.
- [61] Willker, W.; Engelmann, J.; Brand, A.; Leibfritz, D. (1996): Metabolite Identification in Cell Extracts and Culture Media by Proton-Detected 2D- ^1H , ^{13}C -NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* **3**: 193-198.
- [62] Gray, H.F.; Maxwell, R.J.; Martínez-Pérez, I.; Arús, C.; Cerdán, S. (1998): Genetic Programming for Classification and Feature Selection: Analysis of ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra from Human Brain Tumour Biopsies. *NMR Biomed.* **11**: 217-224.

- [63] Maxwell, R.J.; Martínez-Pérez, I.; Cerdán, S.; Cabañas, M.E.; Arús, C.; Moreno, À.; Capdevila, A.; Ferrer, E.; Bartomeus, F.; Aparicio, A.; Conesa, G.; Roda, J.M.; Carceller, F.; Pascual, J.M.; Howells, S.L.; Mazucco, R.; Griffiths, J.R. (1998): Pattern Recognition Analysis of ^1H NMR Spectra from Perchloric Acid Extracts of Human Brain Tumor Biopsies. *Magn. Reson. Med.* **39**: 869-877.
- [64] Griffin, J.L.; Williams, H.J.; Sang, E.; Clarke, K.; Rae, C.; Nicholson, J.K. (2001): Metabolic Profiling of Genetic Disorders: A Multitissue ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic and Pattern Recognition Study to Dystrophic Tissue. *Anal. Biochem.* **293**: 16-21.
- [65] Lehnhardt, F.-G.; Bock, C.; Röhn, G.; Ernestus, R.-I.; Hoehn, M. (2005): Metabolic Differences Between Primary and Recurrent Human Brain Tumors: a ^1H NMR Spectroscopic Investigation. *NMR Biomed.* **18**: 371-382.
- [66] Valverde, D.; Quintero, M.R.; Candiota, A.P.; Badiella, L.; Cabañas, M.E.; Arús, C. (2006): Analysis of Changes in the ^1H NMR Spectral Pattern of Perchloric Acid Extracts of C6 Cells with Growth. *NMR Biomed.* **19**: 223-230.
- [67] Katyal, S.L.; Barilaro, L.; Hanin, I. (1985): Lipid Composition of Different Areas of Murine Brain: Effects of Lipid Extraction Procedures. *Lipids* **20**: 201-203.
- [68] Meneses, P.; Para, P.F.; Glonek, T. (1989): ^{31}P NMR of Tissue Phospholipids: a Comparison of Three Tissue Pre-Treatment Procedures. *J. Lipid Res.* **30**: 458-561.
- [69] Sonnewald, U.; Westergaard, N.; Isern, E.; Müller, T.B.; Schousboe, A.; Petersen, S.B.; Unsgård, G. (1993): MRS Evaluation of Brain Metabolites in Extracts from Cell Cultures, Human Tumors and Normal Tissue from Brain: Cholesteryl Ester, Choline Containing Compounds and Creatine as Markers for Development, Differentiation and Pathology. *Int. J. Oncol.* **2**: 545-555.
- [70] Henke, J.; Willker, W.; Engelmann, J.; Leibfritz, D. (1996): Combined Extraction Techniques of Tumour Cells and Lipid/Phospholipid Assignment by Two Dimensional NMR Spectroscopy. *Anticancer Res.* **16**: 1417-1428.
- [71] Le Moyec, L.; Legrand, O.; Larue, V.; Kawakami, M.; Marie, J.P.; Calvo, F.; Hantz, E.; Taillandier, E. (2000): Magnetic Resonance Spectroscopy of Cellular Lipid Extracts from Sensitive, Resistant and Reverting K562 Cells and Flow Cytometry for Investigating the P-Glycoprotein Function in Resistance Reversion. *NMR Biomed.* **13**: 92-101.
- [72] Lehnhardt, F.-G.; Röhn, G.; Ernestus, R.-I.; Grüne, M.; Hoehn, M. (2001): ^1H - and ^{31}P -MR Spectroscopy of Primary and Recurrent Human Brain Tumors In Vitro: Malignancy-Characteristic Profiles of Water Soluble and Lipophilic Spectral Components. *NMR Biomed.* **14**: 307-317.
- [73] Srivastava, N.K.; Pradhan, S.; Mittal, B.; Kumar, R.; Pandey, C.M.; Gowda, G.A.N. (2008): Novel Corrective Equations for Complete Estimation of Human Tissue Lipids After Their Partial Destruction by Perchloric Acid Pre-Treatment: High-Resolution ^1H -NMR-Based Study. *NMR Biomed.* **21**: 89-100.
- [74] Folch, J.; Lees, M.; Sloanestanley, G.H. (1957): A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.
- [75] Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959): A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- [76] Iverson, S.J.; Lang, S.L.C.; Cooper, M.H. (2001): Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue. *Lipids* **36**: 1283-1287.

- [77] Kwee, I.L.; Nakada, T.; Ellis, W.G. (1991): Elevation in Relative Levels of Brain Membrane Unsaturated Fatty Acids in Alzheimer's Disease: High Resolution Proton Spectroscopic Studies of Membrane Lipid Extracts. *Magn. Reson. Med.* **21**: 49-54.
- [78] Tugnoli, V.; Tosi, M.R.; Tinti, A.; Trincherò, A.; Bottura, G.; Fini, G. (2001): Characterization of Lipids from Human Brain Tissues by Multinuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biopolymers* **62**: 297-306.
- [79] Subramanian, A.; Joshi, B.S.; Roy, A.D.; Roy, R.; Gupta, V.; Dang, R.S. (2008): NMR Spectroscopic Identification of Cholesterol Esters, Plasmalogen and Phenolic Glycolipids as Fingerprint Markers of Human Intracranial Tuberculomas. *NMR Biomed.* **21**: 272-288.
- [80] Srivastava, N.K.; Pradhan, S.; Gowda, G.A.N.; Kumar, R. (2010): In Vitro, High-Resolution ^1H and ^{31}P NMR Based Analysis of the Lipid Components in the Tissue, Serum, and CSF of the Patients with Primary Brain Tumors: One Possible Diagnostic View. *NMR Biomed.* **23**: 113-122.
- [81] Pearce, J.M.; Komorski, R.A. (2000): Analysis of Phospholipid Molecular Species in Brain by ^{31}P NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **44**: 215-223.
- [82] Pearce, J.M.; Komorski, R.A.; Mrak, R.E. (2009): Phospholipid Composition of Postmortem Schizophrenic Brain by ^{31}P NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **61**: 28-34.
- [83] Le Belle, J.E.; Harris, N.G.; Williams, S.R.; Bhakoo, K.K. (2002): A Comparison of Cell and Tissue Extraction Techniques Using High-Resolution ^1H -NMR Spectroscopy. *NMR Biomed.* **15**: 37-44.
- [84] Beckonert, O.; Monnerjahn, J.; Bonk, U.; Leibfritz, D. (2003): Visualizing Metabolic Changes in Breast-Cancer Tissue Using ^1H -NMR Spectroscopy and Self-Organizing Maps. *NMR Biomed.* **16**: 1-11.
- [85] Katz-Brull, R.; Seger, D.; Rivenson-Segal, D.; Rushkin, E.; Degani, H. (2002): Metabolic Markers of Breast Cancer: Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Res.* **62**: 1966-1970.
- [86] Jordan, B.F.; Black, K.; Robey, I.F.; Runquist, M.; Powis, G.; Gillies, R.J. (2005): Metabolite Changes in HT-29 Xenograft Tumors Following HIF-1 α Inhibition with PX-478 as Studied by MR Spectroscopy In Vivo and Ex Vivo. *NMR Biomed.* **18**: 430-439.
- [87] Gottschalk, M.; Ivanova, G.; Collins, D.M.; Eustace, A.; O'Connor, R.; Brougham, D.F. (2008): Metabolomic Studies of Human Lung Carcinoma Cell Lines Using In Vitro ^1H NMR of Whole Cells and Cellular Extracts. *NMR Biomed.* **21**: 809-819.
- [88] El-Deredy, W. (1997): Pattern Recognition Approaches in Biomedical and Clinical Magnetic Resonance Spectroscopy: A Review. *NMR Biomed.* **10**: 99-124.
- [89] Tate, R.A. (1997): Statistical Pattern Recognition for the Analysis of Biomedical Magnetic Resonance Spectra. *J. Magn. Reson. Anal.* **3**: 63-78.
- [90] Hagberg, G. (1998): From Magnetic Resonance Spectroscopy to Classification of Tumors. A Review of Pattern Recognition Methods. *NMR Biomed.* **11**: 148-156.
- [91] Lindon, J.C.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. (2001): Pattern Recognition Methods and Applications in Biomedical Magnetic Resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **39**: 1-40.
- [92] Howells, S.L.; Maxwell, R.J.; Howe, F.A.; Peet, A.C.; Griffiths, J.R. (1992): An Investigation of Tumor ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectra by the Application of Chemometric Techniques. *Magn. Reson. Med.* **28**: 214-236.

- [93] Somorjai, R.L.; Nikulin, A.K.; Pizzi, N.; Jackson, D.; Scarth, G.; Dolenko, B.; Gordon, H.; Russell, P.; Lean, C.L.; Delbridge, L.; Mountford, C.E.; Smith, I.C.P. (1995): Computerized Consensus Diagnosis: A Classification Strategy for the Robust Analysis of MR Spectra. I. Application to ^1H Spectra of Thyroid Neoplasms. *Magn. Reson. Med.* **33**: 257-263.
- [94] Somorjai, R.L.; Dolenko, B.; Nikulin, A.K.; Pizzi, N.; Scarth, G.; Zhilkin, P.; Halliday, W.; Fewer, D.; Hill, N.; Ross, I.; West, M.; Smith, I.C.P.; Donnelly S.M.; Kuesel, A.C.; Bri  re, K.M. (1996): Classification of ^1H MR Spectra of Human Brain Neoplasms: The Influence of Preprocessing and Computerized Consensus Diagnosis. *J. Magn. Reson. Imag.* **6**: 437-444.
- [95] Hagberg, G.; Burlina, A.P.; Mader, I.; Roser, W.; Radue, E.W.; Seelig, J. (1995): In Vivo Proton MR Spectroscopy of Human Gliomas: Definition of Metabolic Coordinates for Multi-Dimensional Classification. *Magn. Reson. Med.* **34**: 242-252.
- [96] Tate, R.A.; Watson, D.; Eglen, S.; Arvanitis, T.N.; Thomas, E.L.; Bell, J.D. (1996): Automated Feature Extraction for the Classification of Human In Vivo ^{13}C NMR Spectra Using Statistical Pattern Recognition and Wavelets. *Magn. Reson. Med.* **35**: 834-840.
- [97] Tate, R.A.; Griffiths, J.R.; Martínez-Pérez, I.; Moreno, A.; Barba, I.; Cabañas, M.E.; Watson, D.; Alonso, J.; Bartumeus, F.; Isamat, F.; Ferrer, I.; Vila, F.; Ferrer, E.; Capdevilla, A.; Ar  s, C. (1998): Towards a Method for Automated Classification of ^1H MRS Spectra from Brain Tumors. *NMR Biomed* **11**: 177-191.
- [98] Preul, M.C.; Caramanos, Z.; Leblanc, R.; Villemure, J.G.; Arnold, D.L. (1998): Using Pattern Analysis of In Vivo Proton MRSI Data to Improve the Diagnosis and Surgical Management of Patients with Brain Tumors. *NMR Biomed.* **11**: 192-200.
- [99] **Zell, A.** (1997): Simulation neuronaler Netze. 2., unver  nderter Nachdruck, R Oldenbourg Verlag, München.
- [100] Monnerjahn, J. (1998): Medizinische Datenanalyse mit Selbstorganisierenden Karten. Dissertation. Universität Bremen.
- [101] Andrew, E.R.; Bradbury, A.; Eades, R.G. (1958): Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal Rotated at High Speed. *Nature.* **182**: 1659.
- [102] Lowe, I.J. (1959): Free Induction Decays of Rotating Solids. *Phys. Rev. Lett.* **2**: 285-287.
- [103] Cheng, L.L.; Lean, C.L.; Bogdanova, A.; Wright, S.C., Jr.; Ackermann, J.L.; Brady, T.J.; Garrido, L. (1996): Enhanced Resolution of Proton NMR Spectra of Malignant Lymph Nodes Using Magic-Angle Spinning. *Magn. Reson. Med.* **36**: 653-658.
- [104] Lindon, J.C.; Beckonert, O.P.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. (2009): High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy: Application to Biomedical Studies. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **55**: 79-100.
- [105] Cheng, L.L.; Anthony, D.C.; Comite, A.R.; Black, P.M.; Tzika, A.A.; Gonzalez, R.G. (2000): Quantification of Microheterogeneity in Glioblastoma Multiforme with Ex Vivo High-Resolution Magic-Angle Spinning (HRMAS) Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Neuro. Oncol.* **2**: 87-95.

- [106] Tzika, A.A.; Cheng, L.L.; Goumnerova, L.; Madsen, J.R.; Zurakowski, D.; Astrakas, L.G.; Zarifi, M.K.; Scott, M.; Anthony, D.C.; Gonzalez, R.G.; McL. Black, P. (2002): Biochemical Characterization of Pediatric Brain Tumors by Using In Vivo and Ex Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Neurosurg.* **96**: 1023-1031.
- [107] Matwiyoff, R.J.; Needham, T.E. (1972): Carbon-13 NMR Spectroscopy of Red Blood Cell Suspensions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**: 1158-1164.
- [108] Moon, R.B.; Richards, J.H. (1973): Determination of Intracellular pH by ^{31}P Magnetic Resonance. *J. Biol. Chem.* **248**: 7276-7278.
- [109] Hoult, D.I.; Busby, S.J.W.; Gadian, D.G.; Radda, G.K.; Richards, R.E.; Seely, P.J. (1974): Observation of Tissue Metabolites Using ^{31}P NMR Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **252**: 285-287.
- [110] Navon, G.; Ogawa, S.; Shulman, R.; Yamane, T. (1977): ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Studies of Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 87-91.
- [111] Agris, P.F.; Campbell, I.D. (1982): Proton Nuclear Magnetic Resonance of Intact Friend Leukemia Cells: Phosphorylcholine Increase During Differentiation. *Science* **216**: 1325-1327.
- [112] Bruhn, H.; Frahm, J.; Gyngell, M.L.; Merboldt, K.D.; Hanicke, W.; Sauter, R.; Hamburger, C. (1989): Noninvasive Differentiation of Tumors with Use of Localized H-1 MR Spectroscopy In Vivo: Initial Experience in Patients with Cerebral Tumors. *Radiology* **172**: 541-548.
- [113] Segebarth, C.M.; Baleriaux, D.F.; Luyten, P.R.; den Hollander, J.A. (1990): Detection of Metabolic Heterogeneity of Human Intracranial Tumors In Vivo by ^1H NMR Spectroscopic Imaging. *Magn. Reson. Med.* **13**: 62-66.
- [114] Gill, S.S.; Thomas, D.G.T.; Van Bruggen, N.; Gadian, D.G.; Peden, C.J.; Bell, J.D.; Cox, I.J.; Menon, D.K.; Iles, R.A.; Bryant, D.J.; Coutts, G.A. (1990): Proton MR Spectroscopy of Intracranial Tumors: In Vivo and In Vitro Studies. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **14**: 497-504.
- [115] Gill, S.S.; Small, R.K.; Thomas, D.G.T.; Patel, P. (1989): Brain Metabolites as ^1H NMR Markers of Neuronal and Glial Disorders. *NMR Biomed.* **2**: 196-200.
- [116] Rémy, C.; Arús, C.; Ziegler, A.; Sam-Lai, E.; Moreno, A.; Le Fur, Y.; Décorps, M. (1994): In Vivo, Ex Vivo, and In Vitro One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of an Intracerebral Glioma in Rat Brain: Assignment of Resonances. *J. Neurochem.* **62**: 166-179.
- [117] Urenjak, K.; Williams, S.R.; Gadian, D.G.; Noble, M. (1993): Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Unambiguously Identifies Different Neural Cell Types. *J. Neurosci.* **13**: 981-989.
- [118] Florian, C.L.; Preece, N.E.; Bhakoo, K.K.; Williams, S.R.; Noble, M. (1995): Cell Type-Specific Fingerprinting of Meningioma and Meningeal Cells by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res.* **55**: 420-427.
- [119] Florian, C.L.; Pietsch, T.; Noble, M.; Williams, S.R. (1997): Metabolic Studies of Human Primitive Neuroectodermal Tumor Cells by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Br. J. Cancer* **75**: 1007-1013.
- [120] Sutton, L.N.; Wehrli, S.L.; Gennarelli, L.; Wang, Z.; Zimmerman, R.; Bonner, K.; Rorke, L.B. (1994): High-Resolution ^1H -Magnetic Resonance Spectroscopy of Pediatric Posterior Fossa Tumors In Vitro. *J. Neurosurg.* **94**: 443-448.

- [121] Florian, C.L.; Preece, N.E.; Bhakoo, K.K.; Williams, S.R.; Noble, M. (1996): Characteristic Metabolic Profiles Revealed by ^1H NMR Spectroscopy for Three Types of Human Brain and Nervous System Tumours. *NMR Biomed.* **8**: 253-264.
- [122] Usenius, J.-P.R.; Kaupinnen, R.A.; Vainio, P.A.; Hernesniemi, J.A.; Vapalahti, M.P.; Palvjärvi, A.; Soimakallio, S. (1994): Quantitative Metabolite Patterns of Human Brain Tumors: Detection by ^1H NMR Spectroscopy In Vivo and In Vitro. *J. Comp. Assist. Tomogr.* **18**: 705-713.
- [123] Kinoshita, Y.; Kajiwarra, H.; Yokota, A.; Koga, Y. (1993): Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Astrocytic Tumors: An In Vitro Study. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **33**: 350-359.
- [124] Carpinelli, G.; Carapella, C.M.; Palombi, L.; Raus, L.; Caroli, F.; Podo, F. (1996): Differentiation of Glioblastoma Multiforme from Astrocytomas by In Vitro ^1H MRS Analysis of Human Brain Tumors. *Anticancer Res.* **16**: 1559-1564.
- [125] Kinoshita, Y.; Kajiwarra, H.; Yokota, A.; Koga, Y. (1994): Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Brain Tumors: An In Vitro Study. *Neurosurg.* **35**: 606-614.
- [126] Kinoshita, Y.; Yokota, A. (1997): Absolute Concentrations of Metabolites in Human Brain Tumors Using In Vitro Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *NMR Biomed.* **10**: 2-12.
- [127] Pfeisterer, W.K.; Nieman, R.A.; Scheck, A.C.; Coons, S.W., Spetzler, R.F.; Preul, M.C. (2010): Using Ex Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy to Reveal Associations Between Biochemical and Biological Features of Meningiomas. *Neurosurg. Focus* **28**: 1-8.
- [128] Seijo, L.; Merchant, T.E.; van der Ven, L.T.M.; Glonek, T. (1994): Meningioma phospholipid profiles measured by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Lipids* **29**: 359-364.
- [129] Merchant, T.E.; van der Ven, L.T.M.; Minsky, B.D.; Diamantis, P.M.; Delapaz, R.; Galicich, J.; Glonek, T. (1994): ^{31}P NMR Phospholipid Characterization of Intracranial Tumors. *Brain Res.* **649**: 1-6.
- [130] Podo, F.; de Certaines, J.D. (1996): Magnetic Resonance Spectroscopy in Cancer: Phospholipid, Neutral Lipid and Lipoprotein Metabolism and Function. *Anticancer Res.* **16**: 1305-1316.
- [131] Podo, F. (1999): Tumor Phospholipid Metabolism. *NMR Biomed.* **12**: 413-439.
- [132] Tugnoli, V.; Tosi, M.R.; Bertoluzza, A.; Barbarella, G.; Ricci, R.; Fini, G. (1999): In Vitro Magnetic Resonance Spectroscopy of Healthy and Neoplastic Brain Tissues. *J. Mol. Struct.* **482**: 365-369.
- [133] Tosi, M.R.; Bottura, G.; Lucchi, P.; Reggiani, A.; Trinchero, A.; Tugnoli, V. (2003): Cholesteryl Esters in Human Malignant Neoplasms. *Int. J. Mol. Med.* **11**: 95-98.
- [134] Lombardi, V.; Valko, L.; Valko, M.; Scozzafava, A.; Morris, H.; Melnik, M.; Svitel, J.; Budešinský, M.; Pelnár, J.; Steno, J.; Liptaj, T.; Zaliibera, L.; Budinská, J.; Zlatoš, J.; Gjuliani, A.; Mascolo, L.; Leibfritz, D. (1997): ^1H NMR Ganglioside Ceramide Resonance Region on the Differential Diagnosis of Low and High Malignancy of Brain Gliomas. *Cell. Mol. Neurobiol.* **17**: 521-535.
- [135] Tugnoli, V.; Tosi, M.R.; Barbarella, G.; Bertoluzza, A.; Ricci, R.; Trevisan, C. (1996): In Vivo ^1H MRS and In Vitro Multinuclear MR Study of Human Brain Tumors. *Anticancer Res.* **16**: 2891-2900.
- [136] Tugnoli, V.; Tosi, M.R.; Barbarella, G.; Ricci, R.; Calducci, F.; Bertoluzza, A. (1997): In Vitro and In Vivo MRS Study of Human Glioma Metabolites. *Int. J. Oncol.* **11**: 319-324.

- [137] Kotitschke, K.; Jung, H.; Nekolla, S.; Haase, A.; Bauer, A.; Bogdahn, U. (1994): High-Resolution One- and Two-Dimensional ^1H MRS of Human Brain Tumor and Normal Glial Cells. *NMR Biomed.* **7**: 111-120.
- [138] Rutter, A.; Hugenholtz, H.; Saunders, J.K.; Smith, I.C.P. (1995): Classification of Brain Tumors by Ex Vivo ^1H NMR Spectroscopy. *J. Neurochem.* **64**: 1655-1661.
- [139] Arnold, D.L.; Shoubridge, E.A.; Villemure, J.-G.; Feindel, W. (1990): Proton and Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy of Human Astrocytomas In Vivo. Preliminary Observations on Tumor Grading. *NMR Biomed.* **4**: 184-189.
- [140] Negendank, W.; Sauter, R. (1996): Intratumoral Lipids in ^1H MRS In Vivo in Brain Tumors: Experience of the Siemens Cooperative Clinical Trial. *Anticancer Res.* **16**: 1533-1538.
- [141] Kuesel, A.C.; Donnelly, S.M.; Halliday, W.; Sutherland, G.R.; Smith, I.C.P. (1994): Mobile Lipids and Metabolic Heterogeneity of Brain Tumors as Detectable by Ex Vivo ^1H MR Spectroscopy. *NMR Biomed.* **7**: 172-180.
- [142] Kuesel, A.C.; Sutherland, G.R.; Halliday, W.; Smith, I.C.P. (1994): ^1H MRS of High Grade Astrocytomas: Mobile Lipid Accumulation in Necrotic Tissue. *NMR Biomed.* **7**: 149-155.
- [143] Kuesel, A.C.; Briere, K.M.; Halliday, W.; Sutherland, G.R.; Donnelly, S.M.; Smith, I.C.P. (1996): Mobile Lipid Accumulation in Necrotic Tissue of High Grade Astrocytomas. *Anticancer Res.* **16**: 1485-1489.
- [144] Rémy, C.; Fouilhé, N.; Barba, I.; Sam-Lai, E.; Lahrech, H.; Cucurella, M.-G.; Izquierdo, M.; Moreno, A.; Ziegler, A.; Massarelli, R.; Décorps, M.; Arús, C. (1997): Evidence That Mobile Lipids Detected in Rat Brain Glioma by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Correspond to Lipid Droplets. *Cancer Res.* **57**: 407-414.
- [145] Barba, I.; Cabañas, M.E.; Arús, C. (1999): The Relationship Between Nuclear Magnetic Resonance-Visible Lipids, Lipid Droplets, and Cell Proliferation in Cultured C6 Cells. *Cancer Res.* **59**: 1861-1868.
- [146] Rosi, A.; Luciani, A.M.; Matarrese, P.; Arancia, G.; Viti, V.; Guidoni, L. (1999): ^1H -MRS Lipid Signal Modulation and Morphological and Ultrastructural Changes Related to Tumor Cell Proliferation. *Magn. Reson. Med.* **42**: 248-257.
- [147] Griffin, J.L.; Kaupinnen, R.A. (2007): A Metabolomics Perspective of Human Brain Tumours. *FEBS J.* **274**: 1132-1139.
- [148] Cheng, L.L.; Chang, I.-W.; Louis, D.N.; Gonzalez, R.G. (1998): Correlation of High-Resolution Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy with Histopathology of Intact Human Brain Tumor Specimens. *Cancer Res.* **58**: 1825-1832.
- [149] Barton, S.J.; Howe, F.A.; Tomlins, A.M.; Cudlip, S.A.; Nicholson, J.K.; Bell, B.A.; Griffiths, J. (1999): Comparison of In Vivo ^1H MRS of Human Brain Tumours with ^1H HR-MAS Spectroscopy of Intact Biopsy Samples In Vitro. *MAGMA* **8**: 121-128.
- [150] Tugnoli, V.; Schenetti, L.; Mucci, A.; Parenti, F.; Cagnoli, R.; Righi, V.; Trincherò, A.; Nocetti, L.; Toraci, C.; Mavilla, L.; Trentini, G.; Zunarelli, E.; Tosi, M.R. (2006): Ex Vivo HR-MAS MRS of Human Meningiomas: A Comparison with In Vivo ^1H MR Spectra. *Int. J. Mol. Med.* **18**: 859-869.
- [151] Wilson, M.; Davies, N.P.; Grundy, R.G.; Peet, A.C. (2009): A Quantitative Comparison of Metabolite Signals as Detected by In Vivo MRS with Ex Vivo ^1H HR-MAS for Childhood Brain Tumors. *NMR Biomed.* **22**: 213-219.
- [152] Opstad, K.S.; Wright, A.J.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. (2010): Correlations Between In Vivo ^1H MRS and Ex Vivo ^1H HRMAS Metabolite Measurements in Adult Human Gliomas. *J. Magn. Reson. Imag.* **31**: 289-297.

- [153] Opstad, K.S.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. (2008): An Investigation of Human Brain Tumour Lipids by High-Resolution Magic Angle Spinning ^1H MRS and Histological Analysis. *NMR Biomed.* **21**: 677-685.
- [154] Valonen, P.K.; Griffin, J.L.; Lehtimäki, K.K.; Liimatainen, T.; Nicholson, J.K.; Gröhn, O.H.J.; Kaupinnen, R.A. (2005): High-Resolution Magic-Angle-Spinning ^1H NMR Spectroscopy Reveals Different Responses in Choline-Containing Metabolites Upon Gene Therapy-Induced Programmed Cell Death in Rat Brain Glioma. *NMR Biomed.* **18**: 252-259.
- [155] Griffin, J.L.; Blenkiron, C.; Valonen, P.K.; Caldas, C.; Kaupinnen, R.A. (2006): High-Resolution Magic Angle Spinning ^1H NMR Spectroscopy and Reverse Transcription-PCR Analysis of Apoptosis in a Rat Glioma. *Anal. Chem.* **78**: 1546-1552.
- [156] Opstad, K.S.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. (2009): Taurine: A Potential Marker of Apoptosis in Gliomas. *Br. J. Cancer* **100**: 789-794.
- [157] Tzika, A.A.; Astrakas, L.; Cao, H.; Mintzopoulos, D.; Andronesi, O.C.; Mindrinos, M.; Zhang, J.; Rahme, L.G.; Blekas, K.D.; Likas, A.C.; Galatsanos, N.P.; Carrol, R.S. (2007): Combination of High-Resolution Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Microscale Genomics to Type Brain Tumor Biopsies. *Int. J. Mol. Med.* **20**: 199-208.
- [158] Peet, A.C.; McConville, C.; Wilson, M.; Levine, B.A.; Reed, M.; Dyer, S.A.; Edwards, E.C.; Strachan, M.C.; McMullan, D.J.; Wilkes, T.M.; Grundy, R.G. (2007): ^1H MRS Identifies Specific Metabolite Profiles Associated with MYCN-Amplified and Non-Amplified Tumour Subtypes of Neuroblastoma Cell Lines. *NMR Biomed.* **20**: 692-700.
- [159] Mirbahai, L.; Wilson, M.; Shaw, C.S.; McConville, C.; Malcomson, R.D.; Griffin, J.L.; Kaupinnen, R.A.; Peet, A.C. (2011): ^1H Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolites as Biomarkers for Cell Cycle Arrest and Cell Death in Rat Glioma Cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**: 990-1001.
- [160] Righi, V.; Roda, J.M.; Paz, J.; Mucci, A.; Tugnoli, V.; Rodriguez-Tarduchy, G.; Barrios, L.; Schenetti, L.; Cerdán, S.; García-Martín, M.L. (2009): ^1H HR-MAS and Genomic Analysis of Human Tumor Biopsies Discriminate Between High and Low Grade Astrocytomas. *NMR Biomed.* **22**: 629-637.
- [161] Righi, V.; Andronesi, O.C.; Mintzopoulos, D.; Black, P.M.; Tzika, A.A. (2010): High-Resolution Magic Angle Spinning Magnetic Resonance Spectroscopy Detects Glycine as a Biomarker in Brain Tumors. *Int. J. Oncol.* **36**: 301-306.
- [162] Srinivasan, R.; Phillips, J.J.; Vandenberg, S.R.; Polley, M.-Y.C.; Bourne, G.; Au, A.; Pirzkall, A.; Cha, S.; Chang, S.M.; Nelson, S.J. (2010): Ex Vivo MR Spectroscopic Measure Differentiates Tumor From Treatment Effects in GBM. *Neuro Oncol.* **12**: 1152-1161.
- [163] Wright, A.; Fellows, G.A.; Griffiths, J.R.; Wilson, M.; Bell, B.A.; Howe, F.A. (2010): Ex-vivo HRMAS of Adult Brain Tumours: Metabolite Quantification and Assignment of Tumour Biomarkers. *Mol. Cancer* **9**: 66.
- [164] Marszałek, R.; Pisklak, M.; Horsztyński, D.; Wawer, I. (2010): ^1H , ^{13}C , ^{31}P MAS NMR Studies of Lyophilized Brain Tumors. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **37**: 21-27.
- [165] Negendank, W. (1992): Studies of Human Tumors by MRS: A Review. *NMR Biomed.* **5**: 303-324.
- [166] Howe, F.A.; Opstad, K.S. (2003): ^1H MR Spectroscopy of Brain Tumours and Masses. *NMR Biomed.* **16**: 123-131.

- [167] Mountford, C.E.; Doran, S.; Lean, C.L.; Rusell, P. (2004): Proton MRS Can Determine the Pathology of Human Cancers with a High Level of Accuracy. *Chem. Rev.* **104**: 3677-3704.
- [168] Hollingworth, W.; Medina, L.S.; Lenkinski, R.E.; Shibata, D.K.; Bernal, B.; Zurakowski, D.; Comstock, B.; Jarvik, J.G. (2006): A Systematic Literature Review of Magnetic Resonance Spectroscopy for the Characterization of Brain Tumors. *AJNR Am J Neuroradiol.* **27**: 1404-1411.
- [169] Smith, I.C.P.; Stewart, L.C. (2002): Magnetic Resonance Spectroscopy in Medicine: Clinical Impact. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **40**: 1-34.
- [170] Sibtain, N.A.; Howe, F.A.; Saunders, D.E. (2007): The Clinical Value of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy in Adult Brain Tumours. *Clin. Radiol.* **62**: 109-119.
- [171] Soares, D.P.; Law, M. (2009): Magnetic Resonance Spectroscopy of the Brain: Review of Metabolites and Clinical Applications. *Clin. Radiol.* **64**: 12-21.
- [172] Van der Graaf, M. (2010): In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy: Basic Methodology and Clinical Applications. *Eur. Biophys. J.* **39**: 527-540.
- [173] Barker, P.B.; Lin, D.D.M. (2006): In Vivo Proton MR Spectroscopy of the Human Brain. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **49**: 99-128.
- [174] Nelson, S.J. (2003): Multivoxel Magnetic Resonance Spectroscopy of Brain Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 497-507.
- [175] Gartland, K.P.; Sanins, S.M.; Nicholson, J.K.; Sweatman, B.C.; Bedell, C.R.; Lindon, J.C. (1990): Pattern Recognition Analysis of High Resolution ^1H NMR Spectra of Urine. A Nonlinear Mapping Approach to the Classification of Toxicological Data. *NMR Biomed.* **3**: 166-172.
- [176] Lisboa, P.J.G.; Kirby, S.P.J.; Vellido, A.; Lee, Y.Y.B.; El-Deredy, W. (1998): Assessment of Statistical and Neural Networks Methods in NMR Spectral Classification and Metabolite Selection. *NMR Biomed.* **11**: 225-234.
- [177] Solivera, J.; Cerdán, S.; Pascual, J.M.; Barrios, L.; Roda, J.M. (2009): Assessment of ^{31}P -NMR Analysis of Phospholipid Profiles for Potential Differential Diagnosis of Human Cerebral Tumors. *NMR Biomed.* **22**: 663-674.
- [178] Faria, A.V.; Macedo Jr., F.C.; Marsaioli, A.J.; Ferreira, M.M.; Cendes, F. (2011): Classification of Brain Tumor Extracts by High Resolution ^1H MRS Using Partial Least Squares Discriminant Analysis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**: 149-164.
- [179] Griffin, J.L.; Bollard, M.; Nicholson, J.K.; Bhakoo, K. (2002): Spectral Profiles of Cultured Neuronal and Glial Cells Derived from HRMAS ^1H -NMR Spectroscopy. *NMR Biomed.* **15**: 375-384.
- [180] Pouillet, J.-B.; Martinez-Bisbal, M.C.; Valverde, D.; Monleon, D.; Celda, B.; Arús, C.; Van Huffel, S. (2007): Quantification and Classification of High-Resolution Magic Angle Spinning Data for Brain Tumor Diagnosis. Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale, Lyon, France August 23-26, 2007.
- [181] Erb, G.; Elbayed, K.; Piotto, M.; Raya, J.; Neuville, A.; Mohr, M.; Maitrot, D.; Kehrli, P.; Namer, I.J. (2008): Toward Improved Grading of Malignancy in Oligodendrogliomas Using Metabolomics. *Magn. Reson. Med.* **59**: 959-965.
- [182] Sjøbakk, T.E.; Johansen, R.; Bathen, T.F.; Sonnewald, U.; Juul, R.; Torp, S.H.; Lundgren, S.; Gribbestad, I.S. (2008): Characterization of Brain Metastases Using High-Resolution Magic Angle Spinning MRS. *NMR Biomed.* **21**: 175-185.

- [183] Wilson, M.; Davies, N.P.; Brundler, M.-A.; McConville, C.; Grundy, R.G.; Peet, A.C. (2009): High Resolution Magic Angle Spinning ^1H NMR of Childhood Brain and Nervous System Tumours. *Mol. Cancer* **8**: 6.
- [184] Andronesi, O.C.; Blekas, K.D.; Mintzopoulos, D.; Astrakas, L.; Black, P.M.; Tzika, A.A. (2008): Molecular Classification of Brain Tumor Biopsies Using Solid-State Magic Angle Spinning Proton Magnetic Resonance Spectroscopy and Robust Classifiers. *Int. J. Oncol.* **33**: 1017-1025.
- [185] Usenius, J.P.; Tuohimetsä, S.; Vaino, P.; Ala-Korpela, M.; Hiltunen, Y.; Kaupinnen, R.A. (1996): Automated Classification of Human Brain Tumors by Neural Network Analysis Using In Vivo ^1H Magnetic Resonance Spectroscopic Metabolite Phenotypes. *Neuroreport*. **7**: 1597-1600.
- [186] Poptani, H.; Kaartinen, J.; Gupta, R.K.; Niemitz, M.; Hiltunen, Y.; Kaupinnen, R.A. (1999): Diagnostic Assessment of Brain Tumours and Non-Neoplastic Brain Disorders In Vivo Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Artificial Neural Networks. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**: 343-349.
- [187] Tate, A.R.; Majós, C.; Moreno, A.; Howe, F.A.; Griffiths, J.R.; Arús, C. (2003): Automated Classification of Short Echo Time in In Vivo ^1H Brain Tumor Spectra: A Multicenter Study. *Magn. Reson. Med.* **49**: 29-36.
- [188] Herminghaus, S.; Dierks, T.; Pilatus, U.; Möller-Hartmann, W.; Wittsack, J.; Marquardt, G.; Labisch, C.; Lanfermann, H.; Schlote, W.; Zanella, F.E. (2003): Determination of Histopathological Tumor Grade in Neuroepithelial Brain Tumors by Using Spectral Pattern Analysis of In Vivo Spectroscopic Data. *J. Neurosurg.* **98**: 74-81.
- [189] Majós, C.; Julià-Sapé, M.; Alonso, J.; Serrallonga, M.; Aguilera, C.; Acebes, J.J.; Arús, C.; Gili, J. (2004): Brain Tumor Classification by Proton MR Spectroscopy: Comparison of Diagnostic Accuracy at Short and Long TE. *Am. J. Neuroradiol.* **25**: 1696-1704.
- [190] Opstad, K.S.; Ladroue, C.; Bell, B.A.; Griffiths, J.R.; Howe, F.A. (2007): Linear Discriminant Analysis of Brain Tumour ^1H MR Spectra: A Comparison of Classification Using Whole Spectra Versus Metabolite Quantification. *NMR Biomed* **20**: 763-770.
- [191] De Eldelenyi, F.S.; Rubin, C.; Estéve, F.; Grand, S.; Décorps, M.; Lefournier, V.; Le Bas, J.-F.; Rémy, C. (2000): A New Approach for Analyzing Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Images of Brain Tumors: Nosologic Images. *Nat. Med.* **6**: 1287-1289.
- [192] Simonetti, A.W.; Melssen, W.J.; de Edelenyi, F.S.; van Asten, J.J.A.; Heerschap, A.; Buydens, L.M. (2005): Combination of Feature-Reduced MR Spectroscopic and MR Imaging Data for Improved Brain Tumor Classification. *NMR Biomed.* **18**: 34-43.
- [193] Young, K.; Govind, V.; Sharma, K.; Studholme, C.; Maudsley, A.A.; Schuff, N. (2010): Multivariate Statistical Mapping of Spectroscopic Imaging Data. *Magn. Reson. Med.* **63**: 20-24.
- [194] Wright, A.J.; Arús, C.; Wijnen, J.P.; Moreno-Torres, A.; Griffiths, J.R.; Celda, B.; Howe, F.A. (2008): Automated Quality Control Protocol for MR Spectra of Brain Tumors. *Magn. Reson. Med.* **59**: 1274-1281.
- [195] Croitor Sava, A.; Martinez-Bispa, M.C.; Van Huffel, S.; Cerda, J.M.; Sima, D.M.; Celda, B. (2011): Ex Vivo High Resolution Magic Angle Spinning Metabolic Profiles Describe Intratumoral Histopathological Tissue Properties in Adult Human Gliomas. *Magn. Reson. Med.* **65**: 305-312.

- [196] Lamari, F.; La Schiazza, R.; Guillevin, R.; Hainque, B.; Foglietti, M.-J.; Beaudeau, J.-L.; Bernard, M. (2008): Exploration Biochimique du Métabolisme Énergétique et du Stress Oxydant des Gliomes de Bas Grade: Analyse du Tissu Tumoral Central et Périphérique. *Ann. Biol. Clin.* **66**: 143-150.
- [197] Stadlbauer, A.; Nimsky, C.; Buslei, R.; Pinker, K.; Gruber, S.; Hammen, T.; Buchfelder, M.; Ganslandt, O. (2007): Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging in the Border Zone of Gliomas: Correlation of Metabolic and Histological Changes at Low Tumor Infiltration – Initial Results. *Invest. Radiol.* **42**: 218-223.
- [198] Di Costanzo, A.; Scarabino, T.; Trojsi, F.; Giannatempo, G.M.; Popolizio, T.; Catapano, D.; Bonavita, S.; Maggialelli, N.; Tosetti, M.; Salvolini, U.; d'Angelo, V.A.; Tedeschi, G. (2006): Multiparametric 3T MR Approach to the Assessment of Cerebral Gliomas: Tumor Extent and Malignancy. *Neuroradiology* **48**: 622-631.
- [199] Wright, A.J.; Fellows, G.; Byrnes, T.J.; Opstad, K.S.; McIntyre, D.J.O.; Griffiths, J.R.; Bell, B.A.; Clark, C.A.; Barrick, T.R.; Howe, F.A. (2009): Pattern Recognition of MRSI Data Shows Regions of Glioma Growths That Agree With DTI Markers of Brain Tumor Infiltration. *Magn. Reson. Med.* **62**: 1646-1651.
- [200] Fan, T.W.-M. (1996): Metabolite Profiling by One- and Two-Dimensional NMR Analysis of Complex Mixtures. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **28**: 161-219.
- [201] Willker, W.; Leibfritz, D. (1998): Assignment of Mono- and Polyunsaturated Fatty Acids in Lipids of Tissue and Bodyfluids. *Magn. Reson. Chem.* **36**: 79-84.
- [202] Jennemann, R.; Rodden A.; Bauer, B.L.; Mennel, H.-D.; Wiegandt, H. (1990): Glycosphingolipids of Human Gliomas. *Cancer Res* **50**: 7444-7449.
- [203] Singh, L.P.K.; Pearl, D.K.; Franklin, T.K.; Spring, P.M.; Scheithauer, B.W.; Coons, S.W.; Johnsson, P.C.; Pfeiffer, S.E.; Li, J.; Knott, J.C.A.; Yates, A.J. (1994): Neutral Glycolipid Composition of Primary Human Brain Tumors. *Mol. Chem. Neuropathol.* **21**: 241-257.
- [204] Beljebbar, A.; Amharref, N.; Lévêques, A.; Dukic, S.; Venteo, L.; Schneider, L.; Pluot, M.; Manfait, M. (2008): Modeling and Quantifying Biochemical Changes in C6 Tumor Gliomas by Fourier Transform Infrared Imaging. *Anal. Chem.* **80**: 8406-8415.
- [205] Eckhardt, M. (2008): The Role and Metabolism of Sulfatide in the Nervous System. *Mol. Neurobiol.* **37**: 93-103.
- [206] Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. (2008): Principles of Bioactive Lipid Signaling: Lessons from Sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 139-150.
- [207] Riboni, L.; Campanella, R. (2002): Ceramide Levels are Inversely Associated with Malignant Progression of Human Glial Tumors. *Glia* **39**: 105-113.
- [208] Dumitru, C.A.; Weller, M.; Gulbins, E. (2009): Ceramide Metabolism Determines Glioma Cell Resistance to Therapy. *J. Cell Physiol.* **221**: 688-695.
- [209] Hedberg, K.M.; Mahesparan, R.; Read, T.-A.; Tysnes, B.B.; Thorsen, F.; Visted, T.; Bjerkvig, R.; Fredman, P. (2001): The Glioma-associated Gangliosides 3'-isoLM1, GD3 and GM2 Show Selective Area Expression in Human Glioblastoma Xenografts in Nude Rat Brains. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **27**: 451-464.
- [210] Chojnacki, T.; Dallner, G. (1988): The Biological Role of Dolichol. *Biochem. J.* **251**: 1-9.
- [211] Ward, W.; Guan, Z.; Zucca, F.A.; Fariello, R.G.; Kordestani, R.; Zecca, L.; Raetz, C.R.H.; Simon, J.D. (2007): Identification and Quantification of Dolichol and Dolichoic Acid in Neuromelanin from Substantia Nigra of the Human Brain. *J. Lipid Res.* **48**: 1457-1462.

- [212] Waechter, C.H.; Lennarz, W.J. (1976): The Role of Polyprenol-linked Sugars in Glycoproteinsynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 95-112.
- [213] D'Alexandri, F.L.; Gozzo, F.C.; Eberlin, M.N.; Katzin, A.M. (2006): Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Polyisoprenoid Alcohols via Li^+ Cationization. *Anal. Biochem.* **355**: 189-200.
- [214] Swiezewska, E.; Danikewitz, W. (2005): Polyisoprenoids: Structure, Biosynthesis and Function. *Prog. Lipid Res.* **44**: 235-258.
- [215] Söderberg, M.; Edlund, C.; Kristensson, K.; Dallner, G. (1990): Lipid Compositions of Different Regions of the Human Brain During Aging. *J. Neurochem.* **54**: 415-423.
- [216] Sabine, J.R. (1976): Metabolic Controls in Precancerous Liver-VII. Time Course of Loss of Dietary Feedback Control of Cholesterol Synthesis During Carcinogen Treatment. *Eur. J. Cancer* **12**: 299-303.
- [217] Yamamoto, H.; Swoger, J.; Greene, S.; Saito, T.; Hurh, J.; Sweely, C.; Leestma, J.; Mkrdichian, E.; Cerullo, L.; Nishikawa, A.; Ihara, Y.; Taniguchi, N.; Moskal, J.R. (2000): β 1,6-N-Acetylglucosamine-bearing N-Glycans in Human Gliomas: Implications for a Role in Regulating Invasivity. *Cancer Res.* **60**: 134-142.
- [218] Xu, S.; Zhu, X.; Zhang, S.; Yin, S.; Zhou, L.; Chen, C.; Gu, J. (2001): Over-expression of Beta-1,4-Galactosyltransferase I, II und V in Human Astrocytoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 502-506.
- [219] Söderberg, M.; Edlund, C.; Alafuzoff, I.; Kristensson, K.; Dallner, G. (1992): Lipid Composition in Different Regions of the Brain in Alzheimer's Disease/ Senile Dementia of Alzheimer's Type. *J. Neurochem.* **59**: 1646-1653.
- [220] Peeling, J.; Wong, D.; Sutherland, G.R. (1989): Nuclear Magnetic Resonance Study of Regional Metabolism after Forebrain Ischemia in Rats. *Stroke* **20**: 633-640.
- [221] Brand, A.; Richter-Landsberg, C.; Leibfritz, D. (1993): Multinuclear NMR Studies on the Energy Metabolism of Glial and Neuronal Cells. *Dev. Neurosci.* **15**, 289-298.
- [222] Beckonert, O. (2000): NMR-Spektroskopie und Mustererkennungsverfahren für die klinische Diagnose. Dissertation. Universität Bremen
- [223] Ross, B.D. (1991): Biochemical Considerations in ^1H Spectroscopy. Glutamate and Glutamine; Myo-Inositol and Related Metabolites. *NMR Biomed.* **4**: 59-63.
- [224] Kaiser, L.G.; Schuff, N.; Cashdollar, N.; Weiner, M.W. (2005): Scyllo-Inositol in Normal Aging Human Brain: ^1H Magnetic Resonance Spectroscopy Study at 4T. *NMR Biomed.* **18**: 51-55.
- [225] Sontheimer, H. (2008): A Role for Glutamate in Growth and Invasion of Primary Brain Tumors. *J. Neurochem.* **105**: 287-295.
- [226] Moreno, A.; Rey, M.; Montane, J.M.; Alonso, J.; Arús, C. (1993): ^1H NMR Spectroscopy of Colon Tumors and Normal Mucosal Biopsies; Elevated Taurine Levels and Reduced Polyethylenglycol absorption in Tumors May Have Diagnostic Significance. *NMR Biomed.* **6**: 111-118.
- [227] Martin, D.D.; Robbins, M.E.C.; Spector, A.A.; Wen, B.-C.; Hussey, D.H. (1996): The Fatty Acid Composition of Human Gliomas Differs from That Found in Nonmalignant Brain Tissue. *Lipids* **31**:1283-1288.

- [228] Kökoğlu, E.; Tüter, Y.; Dandikçi, K.S.; Yazici, Z.; Ulakoğlu, E.Z.; Sönmez, H.; Özyurt, E. (1998): Prostaglandin E₂ Levels in Human Brain Tumor Tissues and Arachidonic Acid Levels in the Plasma Membrane of Human Brain Tumors. *Cancer Lett* **132**: 17-21.
- [229] De Armas, R.; Durand, K.; Guillaudeau, A.; Weinbreck, N.; Robert, S.; Moreau, J.-J.; Caire, F.; Acosta, G.; Chaunavel, A.; Marin, B.; Labrousse, F.; Denizot, Y. (2010): mRNA Levels of Enzymes and Receptors Implicated in Arachidonic Acid Metabolism in Gliomas. *Clin. Biochem.* **43**: 827-835.
- [230] Nygren, C.; von Holst, H.; Månsson, J.E.; Fredman, P. (1997): Increased Levels of Cholesterol Esters in Glioma Tissue and Surrounding Areas of Human Brain. *Br. J. Neurosurg.* **11**: 216-220.
- [231] Van Meer, G.; Voelker, D.R.; Feigenson, G.W. (2008): Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:112-124.
- [232] Yates, A.J.; Thompson, D.K.; Boesel, C.P.; Albrightson, C.; Hart, R.W. (1979): Lipid Composition of Human Neural Tumors. *J. Lipid Res.* **20**: 428-436.
- [233] Lee, T.-C. (1998): Biosynthesis and Possible Biological Functions of Plasmalogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**: 129-145.
- [234] Palma, A.; Grande, S.; Rosi, A.; Luciani, A.M.; Guidoni, L.; Viti, V. (2011): ¹H-MRS Can Detect Aberrant Glycosylation in Tumour Cells: a Study of the HeLa Cell Line. *NMR Biomed.* (epub ahead of print; doi: 10.1002/nbm.1665)
- [235] Sonnewald, U.; Isern, E.; Gribbestad, I. S.; Unsgård, G. (1994): UDP-N-acetylhexosamines and Hypotaurine in Human Glioblastoma, Normal Brain Tissue and Cell Cultures: ¹H-NMR Spectroscopy Study. *Anticancer Res.* **14**: 793-798.
- [236] Denecke, J.; Kranz, C. (2009): Hypoglycolysation Due to Dolichol Metabolism Defects. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**: 888-895.
- [237] Bouzier, A.-K.; Quesson, B.; Valeins, H.; Canioni, P.; Merle, M. (1999): [1-¹³C]Glucose Metabolism in the Tumoral and Nontumoral Cerebral Tissue of a Glioma-Bearing Rat. *J. Neurochem.* **72**: 2445-2455.
- [238] Fafournoux, P.; Bruhat, A.; Jousse, C. (2000): Amino Acid Regulation of Gene Expression. *Biochem. J.* **351**: 1-12.
- [239] Davies, N.P.; Wilson, M.; Nararajan, K.; Sun, Y.; MacPherson, L.; Brundler, M.-A.; Arvanitis, T.N.; Grundy, R.G.; Peet, A.C. (2010): Non-Invasive Detection of Glycine as a Biomarker of Malignancy in Childhood Brain Tumours Using In-Vivo ¹H-MRS at 1.5 Tesla Confirmed by Ex-Vivo High-Resolution Magic-Angle-Spinning NMR. *NMR Biomed.* **23**: 80-87.
- [240] Cubillos, S.; Obregón, F.; Vargas, M.F.; Salazar, L.A.; Lima, L. (2006): Taurine Concentration in Human Gliomas and Meningiomas: Tumoral, Peritumoral and Extratumoral Tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* **583**: 419-422.
- [241] Hattori, T.; Andoh, T.; Sakai, N.; Yamada, H.; Kameyama, Y.; Ohki, K.; Nozawa Y. (1987): Membrane Phospholipid Composition and Membrane Fluidity of Human Brain Tumour: A Spin Label Study. *Neurol. Res.* **9**: 38-43.
- [242] Kökoğlu, E.; Tüter, Y.; Yazici, Z.; Sandikci, K.S.; Sönmez, H.; Ulakoğlu, E.Z.; Özyurt, E. (1998): Profiles of the Fatty Acids in the Plasma Membrane of Human Brain Tumors. *Cancer Biochem. Biophys.* **16**: 301-312.
- [243] Van den Berg, R.A.; Hoefsloot, H.C.J.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; van der Werft, M.J. (2006): Centering, Scaling, and Transformations: Improving the Biological Information Content of Metabolomics Data. *BMC Genomics.* **7**: 142.

- [244] Vesanto, J.; Himberg, J.; Alhoniemi, E.; Parhankangas, J. (2000): SOM Toolbox for Matlab 5. Helsinki University of Technology, Report A57, ISBN 951-22-4951-0.
- [245] Silversand, C.; Haux, C. (1997): Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Separation and Quantification of Lipid Classes: Application to Fish Lipids. *J. Chromatogr. B* **703**: 7-14.
- [246] Schwalbe-Herrmann, M.; Willmann, J.; Leibfritz, D. (2010): Separation of Phospholipid Classes by Hydrophilic Interaction Chromatography Detected by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**: 5179-5183.
- [247] Touchstone, J.C. (1995): Thin-Layer Chromatographic Procedures for Lipid Separation. *J. Chromatogr. B* **671**: 169-195.
- [248] Kaluzny, M.A.; Duncan, L.A.; Merritt, M.V.; Epps, D.E. (1985): Rapid Separation of Lipid Classes in High Yield and Purity Using Bonded Phase Columns. *J. Lipid Res.* **26**: 135-140.
- [249] Kim, H.-Y.; Salem, N. (1990): Separation of Lipid Classes by Solid Phase Extraction. *J. Lipid Res.* **31**: 2285-2289.
- [250] Suzuki, E.; Akimitsu, S.; Kuriki, T.; Miki, T. (1997): Improved Separation and Determination of Phospholipids in Animal Tissues Employing Solid Phase Extraction. *Biol. Pharm. Bull.* **20**: 299-303.
- [251] Sommer, U.; Herscovitz, H.; Welty, F.K.; Costello, C.E. (2006): LC-MS-Based Method for the Qualitative and Quantitative Analysis of Complex Lipid Mixtures. *J. Lipid Res.* **47**: 804-814.
- [252] Willmann, J.; Mahlstedt, K.; Leibfritz, D.; Spraul, M.; Thiele, H. (2007): Characterization of Sphingomyelins in Lipid Extracts Using a HPLC-MS-Offline-NMR Method. *Anal. Chem.* **79**: 4188-4191.
- [253] Ruiz-Gutiérrez, V.; Pérez-Camino, M.C. (2000): Update on Solid-Phase Extraction for the Analysis of Lipid Classes and Related Compounds. *J. Chromatogr. A* **885**: 321-341.
- [254] García Regueiro, J.A.; Gibert, J.; Díaz, I. (1994): Determination of Neutral Lipids from Subcutaneous Fat of Cured Ham by Capillary Gas Chromatography and Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **667**: 225-233.
- [255] Svennerholm, L. (1968): Distribution and Fatty Acid Composition of Phosphoglycerides in Normal Human Brain. *J. Lipid Res.* **9**: 570-579.
- [256] Serhan C.N.; Yacoubian, S.; Yang, R. (2008): Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Annu. Rev. Pathol.* **3**: 279-312.
- [257] Tapiero, H.; Nguyen Ba, G.; Couvreur, P.; Tew, K.D. (2002): Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) and Eicosanoids in Human Health and Pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **56**: 215-222.
- [258] Gleissman, H.; Johnsen, J.I.; Kogner, P. (2010): Omega-3 Fatty Acids in Cancer, the Protectors of Good and the Killers of Evil? *Exp. Cell Res.* **316**: 1365-1373.
- [259] Barenholz, Y. Thompson, T.E. (1999): Sphingomyelin: Biophysical Aspects. *Chem. Phys. Lipids* **102**: 29-34.
- [260] Catala, A. (2009): Lipid Peroxidation of Membrane Phospholipids Generates Hydroxy-Alkenals and Oxidized Phospholipids Active in Physiological Conditions. *Chem. Phys. Lipids* **157**: 1-11.
- [261] Forshed, J.; Schuppe-Koistinen, I.; Jacobsson, S.P. (2003): Peak Alignment of NMR Signals by Means of a Genetic Algorithm. *Anal. Chim. Acta* **487**: 189-199.

- [262] J. Forshed: Matlab Code für Signalanpassung mittels PAGA: URL: <http://www.forshed.se/jenny/index.php?n=Research.SoftwareAmpCode> (aktuell am 15.07.2011).
- [263] Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S.B. (2010): Icoshift: A Versatile Tool for the Rapid Alignment of 1D NMR Spectra. *J. Magn. Reson.* **202**: 190-202.
- [264] Department of Food Science, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen; The Quality and Technology website: Matlab Code für Signalanpassung mittels icoshift: URL: <http://www.models.kvl.dk/source/> (aktuell am 15.07.2011).
- [265] Vesanto, J.; Himberg, J.; Alhoniemi, E.; Parhankangas, J., Helsinki University of Technology, Somtoolbox für Matlab: URL: <http://www.cis.hut.fi/somtoolbox/> (aktuell am 15.07.2011).

Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>Arachidonic Acid</i> (Arachidonsäure)
AAS	Anaplastisches Astrozytom
ANN	<i>Artificial Neural Networks</i> (künstliche neuronale Netze)
AOA	Anaplastisches Oligoastrozytom
AOL	Anaplastisches Oligodendrogliom
AST	Astrozytom
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cholesterol
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i> (Zentrale Hirntumor Registrierungsbehörde der USA)
Cdks	<i>Cyclin dependent kinases</i> (cyclinabhängige Kinasen)
CE	Cholesterolester
CKIs	Cdk-Inhibitor-Proteine
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerid
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHA	Docosahexaensäure
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren)
FA	Freie Fettsäuren
G ₀ -Phase	Ruhephase
G ₁ -Phase	<i>Gap 1</i> (präsynthetische Wachstumsphase)
G ₂ -Phase	<i>Gap 2</i> (postsynthetische Wachstumsphase)
G _T -Phase	Terminale Differenzierungsphase
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBM	Glioblastoma multiforme
GS	Galactosylceramid (auch –cerebrosid)
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HAC	<i>Hierarchical Clustering</i> (hierarchisches Clustern)
HIF1 α	Hypoxie induzierender Faktor
KKR	Korrektklassifikationsrate
k-NN	<i>k-Nearest Neighbour</i> (k nächste Nachbarn)

LA	<i>Linoleic Acid</i> (Linolsäure)
LDA	Lineare Diskriminanten Analyse
LDH	Lactatdehydrogenase
MAG	Monoacylglycerid
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i> (Rotation im magischen Winkel)
MRS	Magnet Resonanz Spektroskopie
M-Phase	Mitose-Phase
MRT	Magnet Resonanz Tomografie
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acids</i> (einfach ungesättigte Fettsäuren)
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> (von Blutplättchen freigesetzter Wachstumsfaktor)
PI	Phosphatidylinositol
PCA	<i>Perchloric acid</i> (Perchlorsäure)
PE	Phosphatidylethanolamin
PE(plas)	Plasmalogene mit PE Kopfgruppe
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
pRB	Retinoblastom-Protein
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RZG	Riesenzellglioblastom
S-Phase	Synthese-Phase
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SOM	<i>Self Organizing Maps</i> (selbstorganisierende Karten)
SPH	Sphingomyelin
TAG	Triacylglycerid
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i> (Trichloressigsäure)
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TSP	Trimethylsilylpropionsäure
UDP-GalNAc	Uridindiphosphogalactosamin
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphoglucosamin
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Medianschnitt durch das menschliche Gehirn.....	3
Abbildung 2: a) Oligodendrogliazelle b) Ausbildung einer Kapillargrenzschicht	5
Abbildung 3: Morphologische Strukturen unterschiedlicher Nervenzelltypen.	6
Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Hirntumorentitäten.	9
Abbildung 5: Zellzyklus eukaryontischer Zellen.	11
Abbildung 6: Mögliche Ursprungszellen für Hirntumoren.	14
Abbildung 7: Gene, die durch HIFs aktiviert werden.	16
Abbildung 8: ^1H -NMR-Spektrum eines lipophilen Gewebeextrakts (Hirntumor).	17
Abbildung 9: ^1H -NMR-Spektrum eines hydrophilen Gewebeextrakts (Hirntumor)...	18
Abbildung 10: Vorgehensweise für die Ermittlung charakteristischer Metabolitenprofile.....	20
Abbildung 11: Veranschaulichung der Unterschiede zwischen a) unüberwachten und b) überwachten Lernverfahren.	26
Abbildung 12: Darstellung der Signalanpassung.	27
Abbildung 13: Reduktion der Spektren durch signalangepasste Segmentierung....	28
Abbildung 14: Veranschaulichung des k-nearest-neighbour-Verfahrens.....	32
Abbildung 15: Drei-schichtiges Neuronales Netz ohne Rückkopplung.....	32
Abbildung 16: a) Aufbau einer selbstorganisierenden Karte b) Lernvorgang.	34
Abbildung 17: ^1H -NMR-Spektren der Lipidextrakte, die über drei verschiedene Techniken erstellt wurden.	43
Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektren der wasserlöslichen Metabolite, die über drei verschiedene Techniken erstellt wurden.	44
Abbildung 19: a) GS-zu-SPH-Verhältnisse in den verschiedenen Tumorsegmenten b) Multipletts der ϵ -Protonen.....	48
Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrenausschnitte von vier Hirntumoren aus unterschiedlichen Bereichen.	49
Abbildung 21: Funktion und Stoffwechsel der Sphingolipide.....	50
Abbildung 22: Lage des unbekannten Signals a) im ^1H -NMR-Spektrum, b) im ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum.	51
Abbildung 23: Darstellung der aus den 2D NMR-Experimenten abgeleiteten Substruktur.	52
Abbildung 24: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aufgetrennten Fraktionen.	53
Abbildung 25: Strukturformeln der analysierten Lipidstandards.	54

Abbildung 26: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der aufkonzentrierten Probe vor der Zugabe von Dolicholphosphat (b) und nach der Zugabe von Dolicholphosphat (a).	55
Abbildung 27: ^1H -NMR-Spektrum der aufkonzentrierten Probe mit vergrößerten Signalbereichen.	55
Abbildung 28: Ausschnitt eines ESI-MS-Spektrums im positiven Ionenmodus.....	56
Abbildung 29: ^1H -NMR-Spektren von 0.80 bis 4.20 ppm der verschiedenen Tumorentitäten und des entfernten Randgebiets.....	61
Abbildung 30: Olefinischer Bereich der ^1H -NMR-Spektren der lipophilen Extrakte..	67
Abbildung 31: Allylische Methylengruppensignale der mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....	68
Abbildung 32: PLS-Score-Plot zur Unterscheidung von Tumorzentrum, Randzone und entferntem Randgebiet (hydrophile Extrakte).	75
Abbildung 33: Histogramme der relativen Integralwerte von a) N-acetylierten Verbindungen (NAA) und b) Creatin.....	76
Abbildung 34: Kartenbelegung der SOM zur Trennung von Tumorzentrum, Tumorrand und entferntem Randgebiet.....	78
Abbildung 35: SOM-Repräsentationen der wichtigsten Metabolite für die Unterscheidung von aktivem Tumor, Tumorrandzone und entferntem Randgebiet.....	79
Abbildung 36: ^1H -Protonenverschiebung der verschiedenen UDP-Hexosen.....	81
Abbildung 37: SOM-Karten für GPCho und PCho.	82
Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrenausschnitte der Cholinregion.	83
Abbildung 39: PLS-Score-Plot zur Trennung von Tumorzentrum und Tumorrand (hydrophile Extrakte).	85
Abbildung 40: SOM-Karten zur Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum und Randzone.....	88
Abbildung 41: SOM-Karten zur Unterscheidung von aktivem Tumorzentrum und Randzone.....	89
Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrumsausschnitt von myo-Inositol und Glycin.	90
Abbildung 43: PLS-Score-Plot zur Trennung von Tumorzentrum, Tumorrandzone und entferntem Randgebiet (lipophile Extrakte).....	92
Abbildung 44: Kartenbelegung und SOM-Repräsentationen der wichtigsten polaren Lipide.	95
Abbildung 45: SOM-Karten der neutralen Lipide.....	97
Abbildung 46: Konzentrationsprofile der gebundenen Fettsäuren.....	98
Abbildung 47: Festphasenextraktion nach Kaluzny.	104

Abbildung 48: Optimierte SPE-Methode zur Auftrennung der Lipidklassen.	105
Abbildung 49: ESI-MS-Spektren ausgewählter SPE-Fractionen.....	106
Abbildung 50: Fettsäureverhältnisse der polaren Lipide in den Tumorzentren, Tumorrundzonen und entf. Randgebieten.....	108
Abbildung 51: Fettsäureverteilung der polaren und neutralen Lipide der Tumorzentren.....	110
Abbildung 52: Ablauf zur Untersuchung auf eine quantitative Gewebeextraktion.	116
Abbildung 53: Vergleich der weiterentwickelten Extraktionstechnik mit bestehenden Verfahren.....	117
Abbildung 54: Ablauf der Extraktionsprozedur.....	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika von Grad I bis IV Tumoren.....	9
Tabelle 2: Ausgewählte Tumorentitäten des ZNS und ihre Graduierung.....	10
Tabelle 3: Reagenzien zur Proteinfällung	22
Tabelle 4: Metabolitkonzentrationen der verschiedenen Extraktionsverfahren.....	45
Tabelle 5: Identifizierte Metabolite in den hydrophilen Extrakten.	46
Tabelle 6: Anzahl der untersuchten Tumorentitäten.....	59
Tabelle 7: Korrektklassifikationsraten für die Unterscheidung von Tumorzentrum, Tumorrand und entf. Randgebiet (hydrophile Extrakte).	77
Tabelle 8: Korrektklassifikationsraten für die Unterscheidung von Tumorzentrum und Tumorrand (hydrophile Extrakte).	86
Tabelle 9: Korrektklassifikationsraten für die Unterscheidung von Tumorzentrum, Tumorrand und entf. Randgebiet (lipophile Extrakte).....	93
Tabelle 10: Wiederfindungsraten der Lipidklassen für die optimierte Methode.....	107
Tabelle 11: NMR-Paramter zur Aufnahme der ¹ H-NMR-Spektren.	122
Tabelle 12: NMR-Parameter zur Quantifizierung der Metabolite.....	123
Tabelle 13: Einstellungen für die 2D NMR-Spektren (Lipide).....	124
Tabelle 14: Einstellungen für die 2D NMR-Spektren (hydrophile Metabolite).....	124
Tabelle 15: Auflistung der untersuchten Tumoren.	126

Publikationsliste

Konferenzbeiträge:

- 2011 F. Nehen, W. Willker, L. Columbano, R. Fahlbusch, D. Leibfritz: *Lipid profile of distinct areas of astrocytic brain tumors*. ISMRM 2011, 3145 (ePoster), Montreal, Kanada
- 2010 F. Nehen, W. Willker, L. Columbano, R. Fahlbusch, D. Leibfritz: *Metabolic profile of lipid extracts obtained by astrocytic brain tumors*. ISMRM 2010, 2768 (Poster), Stockholm, Schweden
- 2010 B. Merkel, F. Nehen, Y. Oezdemir, M. T. Harz, D. Leibfritz, R. Fahlbusch, H. K. Hahn: *Classification on ex-vivo MRS signals of glioma samples*. ISMRM 2010, 3319 (e-Poster), Stockholm, Schweden
- 2009 F. Nehen, W. Willker, R. Fahlbusch, and D. Leibfritz: *Identification of lipids in tissue extracts of astrocytic brain tumors*. ISMRM 2009, 2314 (Poster), Hawaii, USA
- 2009 F. Nehen, D. Leibfritz: *Combination of dual phase and PCA technique for tissue extraction*. ESMRMB 2009, 653 (e-Poster), Antalya, Türkei
- 2008 F. Nehen, D. Leibfritz: *NMR-analysis of lipid extracts of glioma samples*. ESMRMB 2008, 279 (476 e-Poster), Valencia, Spanien

Anhang

1. Beschriftung der funktionellen Gruppen der Lipidklassen

Im Folgenden sind die Kennzeichnungen der funktionellen Gruppen aufgeführt. Bei den Phospholipiden sind die Verschiebungen des Glycerolgrundgerüsts in der Regel gleich, so dass diese in den NMR-Spektren als Glyc α , Glyc β oder Glyc γ bezeichnet wurden.

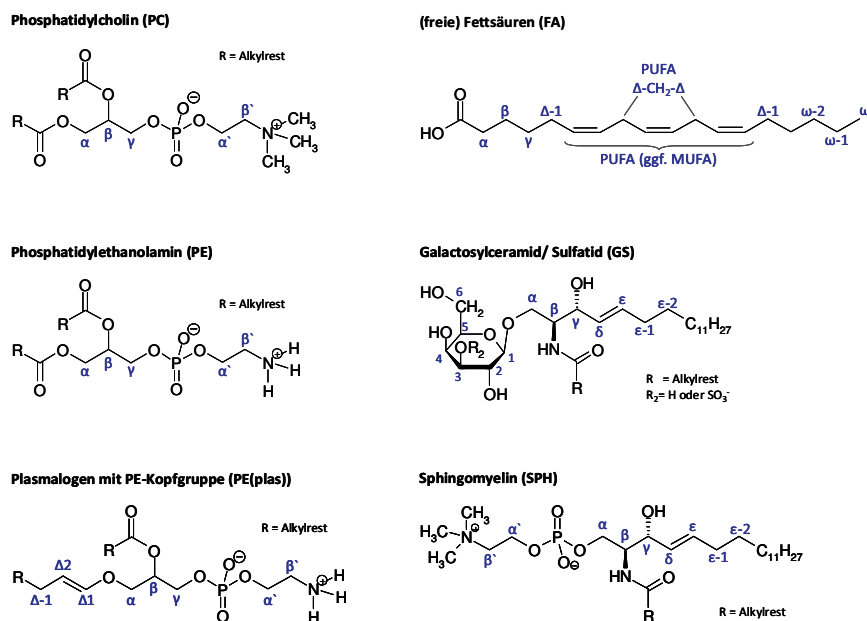


Abbildung A1-1: Verwendete Kennzeichnung der funktionellen Gruppen der (freien) Fettsäuren und der polaren Lipide für die Signalzuordnung.

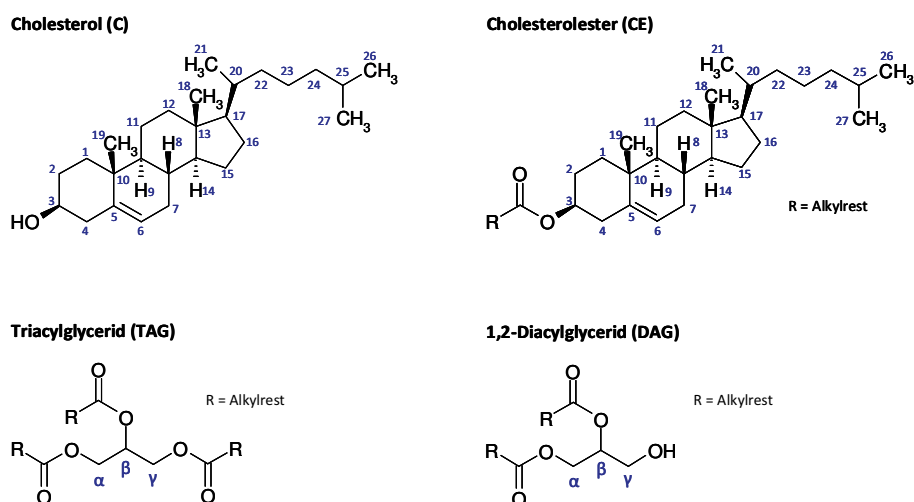


Abbildung A1-2: Kennzeichnung der funktionellen Gruppen der neutralen Lipide.

2. Integrationsbereiche für den Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden

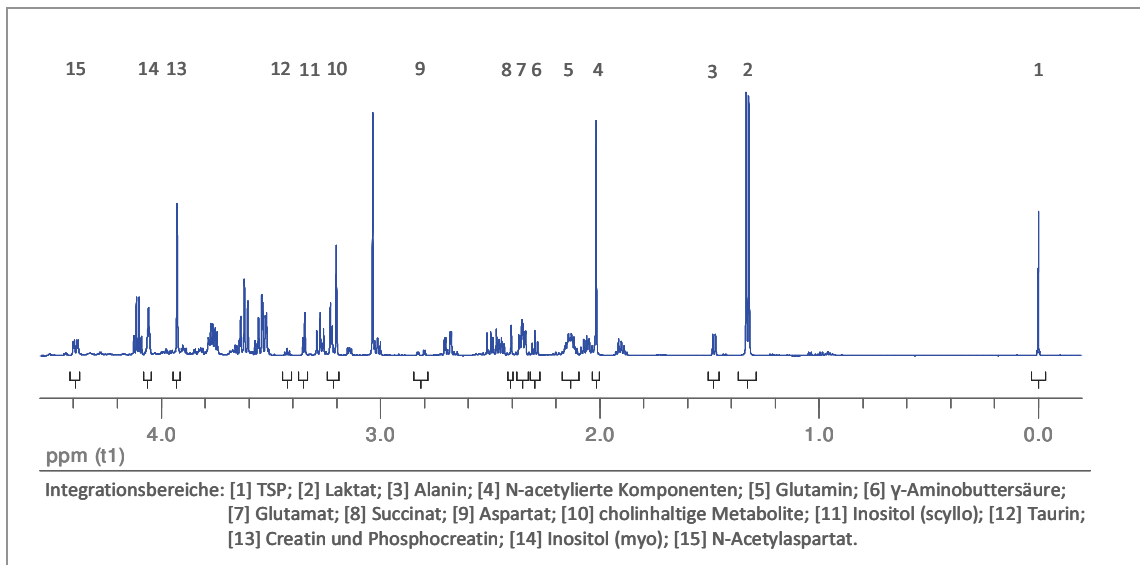


Abbildung A2-1: Integrationsbereiche der hydrophilen Extrakte.

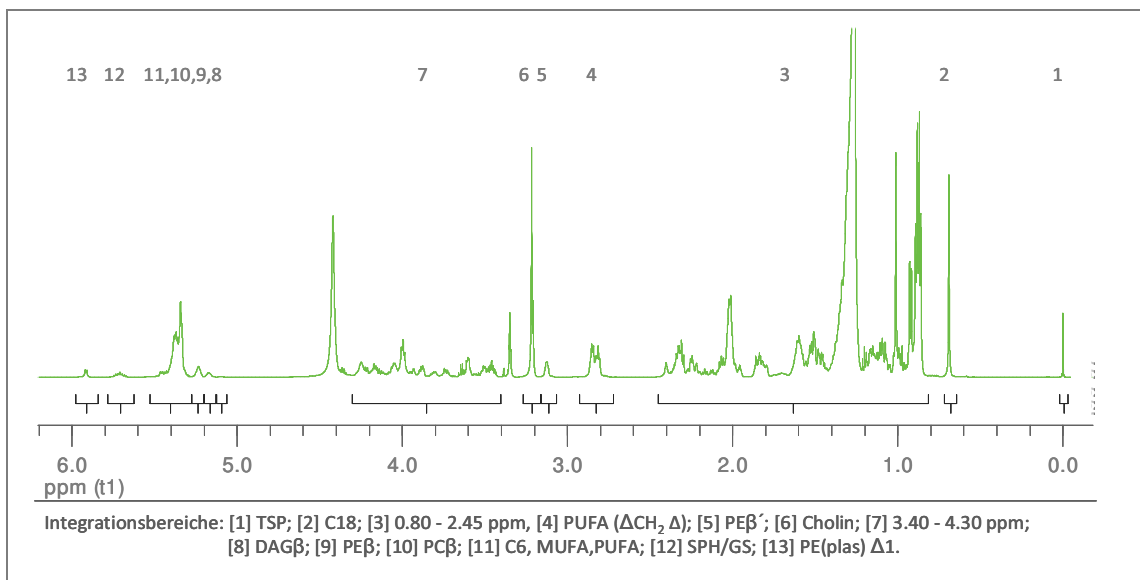


Abbildung A2-2: Integrationsbereiche der lipophilen Extrakte.